

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA CRISTINA CUNICO DALLAGNOL

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE LIGANTES DE
RECEPTORES MUSCARÍNICOS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**



**CURITIBA
2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

JULIANA CRISTINA CUNICO DALLAGNOL

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE LIGANTES DE
RECEPTORES MUSCARÍNICOS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Doutora.

Orientador:
Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves

Coorientador:
Prof. Dr. Diogo Ricardo Bazan Ducatti

CURITIBA
2018

Dallagnol, Juliana Cristina Cunico
Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de ligantes de receptores muscarínicos para o tratamento da doença de Alzheimer / Juliana Cristina
Cunico Dallagnol – Curitiba, 2018.
196 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Alan Guilherme Gonçalves
Coorientador: Professor Dr. Diogo Ricardo Bazan Ducatti
Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Receptores muscarínicos. 2. Adrenérgicos. 3. Histamínicos. 4. Agarose. I. Gonçalves, Alan Guilherme. II. Ducatti, Diogo Ricardo Bazan. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÉUTICAS

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **JULIANA CRISTINA CUNICO DALLAGNOL** intitulada: **PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE LIGANTES DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 26 de Janeiro de 2018.


ALAN GUILHERME GONÇALVES
Presidente da Banca Examinadora


ANGELA CRISTINA LEAL BADARÓ TRINDADE
Avaliador Externo


RILTON ALVES DE FREITAS
Avaliador Interno


ALEXANDRE ORSATO
Avaliador Externo


HUGO VERLI
Avaliador Externo

Dedico esse trabalho aos familiares, cuidadores, psicólogos, terapeutas e demais profissionais da saúde envolvidos com o cuidado de idosos acometidos pela doença de Alzheimer. Por sua dedicação em lembrar e reafirmar seu amor diariamente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde e pelas oportunidades que colocou em meu caminho.

Ao meu marido Ewandro, pelo apoio, incentivo, carinho e paciência. Obrigada pelas conversas que sempre me deram força para continuar e buscar o melhor.

Aos meus pais, Alcides e Marileuza, que me ensinaram a importância do trabalho duro, da perseverança e da honestidade. A minha irmã Carol pelo apoio e paciência.

Aos meus orientadores, Professor Alan e Professor Diogo, Professor Peter Scammells, Ben Capuano e Arthur Christopoulos, pelos ensinamentos, disponibilidade e confiança. Agradeço pelo constante acompanhamento e pelas produtivas discussões.

Aos colegas de laboratório (que estão ou já passaram pelo grupo): Laís, Ingrid, Janaína, Gislaine, Jaqueline, Edson, Stephanie, Matheus, Marina, Camila, Íris, Amanda, Alexandre, e aos ICs Bárbara, Isabel, Andressa Veiga, Michele Mila, Camila de Jesus, Ramon, e à técnica Juliana pela amizade e companheirismo. Também aos colegas da Austrália Manuela, Elham, Emma, Celine, Anitha, Natalie, Jisook, Cassandra, Luke e Jason.

Aos professores Sandra Barreira e Miguel Nosedá, pelo incentivo e amizade.

Aos Departamentos de Farmácia, Departamento de Bioquímica e Departamento de Química da UFPR, especialmente aos professores, Miguel Nosedá, Maria Eugênia Duarte, Guilherme I. Sasaki, Marcelo Müller dos Santos, Luciano Fernandes Huergo, Sandra Barreira, Roberto Pontarolo e Anderson Barison pela disponibilização dos laboratórios e equipamentos. Ao professor Hugo Verli e seus orientados Pablo, Conrado e Rodrigo pelos ensinamentos na área de análise computacional.

Aos membros da banca examinadora, Professor Dr. Hugo Verli, Professor Dr. Alexandre Orsato, Professor Dr. Rilton Alves de Freitas, Professora Dra. Angela Cristina Leal Badaró Trindade e Professora Dra. Sandra Mara Woranovicz Barreira pela disponibilidade e pelas contribuições ao trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, PRONEX-Carboidratos e Fundação Araucária pelo suporte financeiro; a CAPES e ao CNPq pelas bolsas de estudos.

“You cannot hope to build a better world without improving the individuals. To that end, each of us must work in our own improvement and, at the same time, share a general responsibility for all humanity, our particular duty being to aid those to whom we think we can be most useful to.”

Marie Curie

RESUMO

Os receptores muscarínicos são estruturas proteicas transmembrana responsáveis pela transdução de sinais para o interior das células. Os conhecimentos adquiridos à cerca da estrutura dessa maquinaria de sinalização impulsionaram o desenvolvimento de candidatos a fármacos para interação com tais receptores. Desses estudos resultam compostos otimizados, mais seletivos, potentes e seguros. Derivados glicídicos oferecem excelente base para o planejamento de ligantes alvo-específicos. Eles possuem estereoquímica definida e permitem uma infinidade de modificações químicas em suas estruturas. Não obstante, o uso de polissacarídeos para a obtenção de blocos estruturais e modificações químicas para obtenção de substâncias bioativas também apresentam grande potencial nessa área. Este trabalho explorou a utilidade de derivados glicídicos (provenientes das estruturas nativas dos polissacarídeos agarose e *kappa*-carragenana) e não-glicídicos (arilpirróis) para a obtenção de ligantes dos receptores muscarínicos visando a obtenção de novos candidatos a fármacos com melhor perfil farmacológico. O estudo empregou ferramentas de análise computacional que antecederam a fase de síntese. Foram realizadas simulações de atracamento molecular utilizando o programa DockThor e simulações de *druglikeness* utilizando o programa SwissADME. Além dos experimentos de atracamento frente aos receptores muscarínicos do subtipo M₁ e M₃, foram explorados também outros dois tipos de receptores, os adrenérgicos β_2 e histaminérgico H₁ para a interação com derivados glicídicos. De uma biblioteca de 27 compostos hipotéticos, foram identificadas quatro glicaminas capazes de formar complexos receptor-ligante mais estáveis com os diferentes receptores testados, sendo denotada a importância da conformação do anel tetra-hidrofurano e a posição dos grupos hidroxila presentes nessa classe de compostos. A síntese envolveu reações de hidrólise, aminação redutiva e *N*-alquilação para obtenção dos derivados de carboidratos; e reações de *N*-acilação e *N*-alquilação para os arilpirróis. Os rendimentos globais variaram de 19% a 30% para os intermediários glicaminas, aproximadamente 13% para os compostos quaternizado; de 15% a 51% para os intermediários carboxamidas e de 6% a 50% para os derivados arilpirróis finais. Foram testados *in vitro* 41 compostos empregando-se a quantificação de mio-inositol-1-fosfato para avaliação da atividade dos derivados arilpirrólicos em receptores muscarínicos do subtipo M₁. Foi possível identificar um composto capaz de modular a ação do neurotransmissor acetilcolina nos receptores M₁ o qual apresentou perfil farmacológico mais adequado para evitar efeitos adversos graves que ocorrem com o uso dessa classe de compostos no tratamento da doença de Alzheimer.

Palavras-chave: receptores acoplados à proteína G, glicaminas, arilpirróis.

ABSTRACT

Muscarinic receptors are transmembrane proteins involved in cell signaling. Due to the recent discoveries related to their structure and function, the development of drug candidates targeting such receptors has been increasingly successful. These studies resulted in optimized, selective, more potent and safe compounds for clinical uses. Sugar scaffolds provide an excellent platform to design target-specific ligands. They have definite quiral centers and allow a number of chemical modifications in their structures. Nevertheless, the use of polysaccharides to obtain building blocks and their structural modifications, to obtain bioactive substances, has great potential in this area. Herein we explored glycidic derivatives (obtained from the native structures of agarose and *kappa*-carrageenan polysaccharides) and non-glycerides (arylpyrroles) to obtain muscarinic receptor ligands as novel drug candidates presenting better pharmacological profiles. We used computational tools to select compounds prior to the synthesis. Docking experiments were performed using the software DockThor and druglikeness predictions were performed using the SwissADME program. In addition to the docking with the muscarinic receptors M₁ and M₃, other two proteins were tests to the interaction with glycidic derivatives, the β 2 adrenergic and H₁ histaminic receptors. From a library of 27 hypothetical compounds, four glycamines were capable to dock with at least one of the receptors yielding stable receptor-ligand complexes. We denoted the importance of the tetrahydrofuran ring conformation and the position of the hydroxyl groups in the structure of these compounds. Synthesis was achieved using hydrolysis, reductive amination and *N*-alkylation reaction (to obtain the carbohydrate derivatives) and *N*-acylation, *N*-alkylation (to obtain the arylpyrrol derivatives). Overall yields ranged from 19% to 30% for the glycamine intermediates, approximately 13% for the quaternized compounds; from 15% to 51% for the carboxamide intermediates and from 6% to 50% for the final arylpyrrole derivatives. We tested 41 compounds *in vitro* using myo-inositol-1-phosphate accumulation assays to evaluate the activity of the arylpyrrole derivatives at the M₁ muscarinic receptor. We were able to find a compound with improved pharmacological profile, which modulates the efficacy of the neurotransmitter acetylcholine, presenting less inherent potency. This profile is believed to reduce serious adverse effects that occur with this class of compounds in the treatment of Alzheimer's disease.

Key words: G protein-coupled receptors, glycamines, arylpyrroles.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Sítios de ligação no receptor muscarínico M ₁ | 21 |
| Figura 2: Componentes do mecanismo de ação de ligantes alostéricos. | 23 |
| Figura 3: Regiões da molécula modelo BQCA e sua REA. | 24 |
| Figura 4: Moduladores alostéricos representativos no estudo da REA. | 24 |
| Figura 5: Fluxograma da abrangência do trabalho. | 25 |
| Figura 6: Ligantes conhecidos dos mAChR e derivados propostos no trabalho. | 26 |
| Figura 7: Estrutura proteica genérica de um GPCR.. | 29 |
| Figura 8: Representações esquemáticas das mudanças conformacionais de um GPCR. | 32 |
| Figura 9: Representação esquemática da ativação de um GPCR genérico. | 32 |
| Figura 10: Estrutura química genérica de galactanas..... | 35 |
| Figura 11: 3-Hidroxi-muscarina e muscarona | 36 |
| Figura 12: Sobreposição de L01 e (+)-muscarina na interação com o M ₃ AChR..... | 49 |
| Figura 13: Comparação esquemática entre L01 e a (+)-muscarina. | 50 |
| Figura 14: Distâncias entre grupos farmacofóricos e distâncias dos grupos farmacofóricos em relação aos aminoácidos do sítio ativo | 51 |
| Figura 15: Moléculas hipotéticas submetidas ao ensaio de atracamento no M ₃ -mAChR. | 52 |
| Figura 16: Moléculas hipotéticas para ligação em diferentes GPCRs..... | 54 |
| Figura 17: Sobreposição de complexos receptor-ligante..... | 57 |
| Figura 18: Estruturas químicas dos derivados glicamínicos para interação no sítio alostérico. | 58 |
| Figura 19: Atracamento dos derivados L24 , L25 e L26 no sítio alostérico do M ₁ mAChR. | 59 |
| Figura 20: Representação gráfica do modelo BOILED-egg (WLog P vs. TPSA) | 61 |
| Figura 21: Espectrometria de massas do meio reacional da aminação redutiva. | 67 |
| Figura 22: Espectros de RMN de ¹ H das glicaminas 3 , 7 , 8 e <i>epi-8</i> | 72 |
| Figura 23: Comparação do RMN de ¹ H dos compostos 9 , 15 , L01 e D01 | 76 |
| Figura 24: Quantificação de IP ₁ (mio-inositol 1-fosfato) | 79 |
| Figura 25: Espectro de RMN de ¹³ C do composto 2 | 81 |
| Figura 26: Espectro de RMN de ¹ H do composto 3 | 83 |

| | |
|---|-----|
| Figura 27: Mapa de correlação de HSQC ^1H - ^{13}C do composto 3 | 83 |
| Figura 28: RMN de ^1H do composto 7 | 85 |
| Figura 29: Mapa de correlação de HSQC ^1H - ^{13}C do composto 7 | 85 |
| Figura 30: RMN de ^1H do composto 8 e 8 + epi-8 | 87 |
| Figura 31: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C da mistura 8 + epi-8 | 87 |
| Figura 32: RMN de ^1H do composto 9 | 89 |
| Figura 33: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do composto 9 | 89 |
| Figura 34: RMN de ^1H da material bruto contendo composto 11 | 91 |
| Figura 35: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do material bruto contendo 11 | 91 |
| Figura 36: RMN de ^1H do composto 12 (material bruto)..... | 93 |
| Figura 37: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do composto 12 (material bruto) | 93 |
| Figura 38: RMN de ^1H do composto 13 | 95 |
| Figura 39: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do composto 13 | 95 |
| Figura 40: RMN de ^1H do composto 15 | 97 |
| Figura 41: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do composto 15 | 97 |
| Figura 42: RMN de ^1H do composto L01 | 99 |
| Figura 43: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do composto L01 | 99 |
| Figura 44: RMN de ^1H do composto D01 | 101 |
| Figura 45: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do composto D01 | 101 |
| Figura 46: RMN de ^1H do composto L24 | 103 |
| Figura 47: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do composto L24 | 103 |
| Figura 48: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do composto L25 | 104 |
| Figura 49: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do composto L26 | 105 |
| Figura 50: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do composto subL26 | 106 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | |
|---|----|
| Esquema 1: Sínteses de glicaminas e sais de amônio quaternário. | 41 |
| Esquema 2: Sínteses dos derivados <i>N</i> -benzilados..... | 41 |
| Esquema 3: Exemplo de síntese de um derivado arilpirrólico (6a)..... | 42 |
| Esquema 4: Possíveis rotas sintéticas para obtenção do derivado L01 | 64 |
| Esquema 5: Proposta de mecanismo de reação de hidrólise ácida da agarose 1 | 65 |
| Esquema 6: Proposta de mecanismo de reação para aminação redutiva da agarobiose 1b | 66 |
| Esquema 7: Procedimentos de síntese de 3 , 7 , 8 , <i>epi</i> - 8 , 9 e 13 | 70 |
| Esquema 8: Proposta de mecanismo da reação de clivagem oxidativa catalisada por periodato | 72 |
| Esquema 9: Rota sintética para obtenção dos compostos L01 e D01 | 74 |
| Esquema 10: Proposta de mecanismo de reação para <i>N</i> -benzilação..... | 78 |
| Esquema 11: Síntese dos derivados <i>N</i> -benzilados. | 78 |

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Estrutura química e usos clínicos de fármacos atuantes nos receptores muscarínicos 19

Quadro 2: Ligantes conhecidos e protótipos promissores identificados por atracamento molecular.. 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação de parâmetros nos complexos receptor-ligante 49

Tabela 2: Distância entre os grupos farmacofóricos e os aminoácidos do sítio ortostérico com os quais há interação 51

Tabela 3: Comparação da energia de interação de complexos receptor-ligante para os protótipos **L01-L12** nos experimentos de atracamento molecular com receptor M₃-mAChR 53

Tabela 4: Resultados dos experimentos de atracamento em diferentes GPCRs 55

Tabela 5: Resultados dos experimentos de atracamento de **L24**, **L25** e **L26** no M₁ AChR. 58

Tabela 6: Propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e de biodisponibilidade estimados pelas ferramentas *SwissADME* 60

Tabela 7: Possíveis alvos moleculares previstos no programa *SwissTargetPrediction* 63

Tabela 8: Otimização da síntese da glicamina **3** 68

Tabela 9: Otimização dos métodos de purificação na síntese da glicamina **3** 69

Tabela 10: Dados de RMN de ¹H e ¹³C da unidade glicamínica dos compostos **3**, **7** e **8** 71

Tabela 11: Otimização da síntese de *N*-benzil-*N*-metil-glicamina **L26** 77

SIGLAS E ABREVIACÕES

2D: bidimensional
3D: tridimensional
aa: aminoácido
AC: adenilato ciclase
ACh: acetilcolina
ADME: absorção, distribuição, metabolismo e excreção
AnGal: anidro galactose
AMPc: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
AR: receptor adrenérgico
Asn: asparagina
Asp: aspartato
BBs: *building blocks*
BEs: blocos estruturais
BOILED-egg: *brain or intestinal estimated permeation method* ou método para estimativa da permeação gastrointestinal ou da barreira hematoencefálica – modelo ovo
BHE: barreira hematoencefálica
BQCA: *benzoquinoline carboxylic acid* ou ácido benzoquinolínico
calc: calculada
CCD: cromatografia em camada delgada
CHO: *chinese hamster ovary* ou células ovarianas de hamster chinês
CM: carboximetil
conc: concentrado
cypP450: citocromo P450
DA: doença de Alzheimer
DAG: diacilglicerol
DCM: diclorometano
depto.: departamento
DFT: *density function theory* ou teoria do funcional da densidade
DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium* ou meio de cultura Dulbecco modificado
DMF: dimetilformamida
dpm: desintegrações por minuto
ECL: *extracellular loop* ou alça extracelular
ESI-MS: *electrospray ionization mass spectroscopy* ou ionização por eletrodisperção acoplada à espectrometria de massas
equiv: equivalente molar
ERK 1/2: *extracellular signal-regulated kinases* ou quinases extracelulares reguladas
FM: fase móvel ou mistura de eluição
GDP: guanosina difosfatada
Glu: ácido glutâmico
GTP: guanosina trifosfatada
GTPase: hidrolases de GTP
GPCR: *G protein-coupled receptor* ou receptor acoplado à proteína G
gpP: glicoproteína-P
GRKs: *G protein-coupled receptor kinases* ou quinases de receptores acoplados à proteína G
HBA: *H-bond acceptors* ou aceptores de ligação de hidrogênio
HBD: *H-bond donors* ou doadores de ligação de hidrogênio;
HR: receptor histaminérgico
h M₁ mAChR: receptor muscarínico do subtipo M₁ humano.
HCTU: O-(6-clorobenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato
HRMS: *high resolution mass spectroscopy* ou espectrometria de massas de alta resolução

HSQC: *heteronuclear single quantum correlation spectroscopy* ou espectroscopia de correlação heteronuclear de quantum único - a uma ligação de distância

HMBC: *heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy* ou espectroscopia de correlação heteronuclear a múltiplas ligações de distância

HEPES: *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid* ou ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico

LC-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

LRMS: *low resolution mass spectroscopy* ou espectrometria de massas de baixa resolução

Log P: coeficiente de partição óleo/água;

LNCC: laboratório nacional de computação científica

[³H]NMS: *N*-(metil)-escopolamina tritilada

5-HT₂: subtipo de receptor serotoninérgico, 5-hidroxitriptamina

IP₁: inositol-1-fosfato

IP₃: inositol trifosfato

MALDI-TOF: *matrix-assisted laser-desorption time of flight* ou dessorção a laser assistida por matrix com tempo de voo

mAChR: *muscarine acetylcholine receptor* ou receptor muscarínico

MAPT: *microtubule-associated protein tau* ou proteína tau associada aos microtúbulos

MDR1: *multi drug resistance protein 1* ou gene codificador de proteína multidrogas-resistente

min: minutos

m/z: relação massa/carga

NCBI: *national center of biotechnology information* ou centro nacional de informações biotecnológicas

PAM: *positive allosteric modulator* ou moduladores positivos alostéricos

PDB: *protein data bank* ou banco de dados de proteínas

PBS: *phosphate buffer solution* ou tampão fosfato

Phe: fenilalanina

ppm: partes por milhão

p/p: peso/peso

REA: relação estrutura atividade

RMN de ¹³C: ressonância magnética nuclear de carbono-13

RMN de ¹H: ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1

SBF: soro bovino fetal

SI: *sequence identity* ou identidade de sequência

SinHeGli: laboratório de síntese de heterociclos e glicoconjugados

SNC: sistema nervoso central

sol: solubilidade em água

TA: temperatura ambiente

TEA: trietilamina

TFA: ácido trifluoroacético

THF: tetra-hidrofurano

TPSA: *topological polar surface area* ou área polar da superfície;

TM: transmembrana

TMS: tetrametilsilano

Tyr: tirosina

VdW: interações de superfície ou Van der Waals

vs: *versus*

v/v: volume/volume

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1 RECEPTORES MUSCARÍNICOS E LIGANTES ORTOSTÉRICOS | 18 |
| 1.2 MODULADORES ALOSTÉRICOS DOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS | 21 |
| 1.3 VISÃO GERAL | 25 |
| 2 OBJETIVOS | 27 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 27 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 27 |
| 3 REVISÃO | 28 |
| 3.1 RECEPTORES ACOPLADOS À PROTEÍNA G (GPCRs) | 28 |
| 3.1.1 Importância e aspectos históricos | 28 |
| 3.1.2 Estrutura e mecanismos de ativação | 29 |
| 3.1.3 Funções fisiológicas | 32 |
| 3.2 DERIVADOS DE CARBOIDRATOS | 33 |
| 3.2.1 Polissacarídeos no desenvolvimento de compostos ativos | 33 |
| 3.2.2 Galactanas de algas vermelhas | 34 |
| 3.2.3 Síntese de análogos muscarínicos a partir de carboidratos | 36 |
| 3.3 ANÁLISE COMPUTACIONAL | 36 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 38 |
| 4.1 ANÁLISE COMPUTACIONAL | 38 |
| 4.1.1 Estrutura tridimensional dos ligantes | 38 |
| 4.1.2 Estrutura tridimensional dos GPCRs | 38 |
| 4.1.3 Atracamento molecular | 39 |
| 4.2 ANÁLISE TEÓRICA DA VIABILIDADE COMO FÁRMACO (DRUGLIKENESS) E POTENCIAIS ALVOS MOLECULARES (TARGET PREDICTION) | 40 |
| 4.3 SÍNTESE | 40 |
| 4.3.1 Pesquisa de alternativas sintéticas | 40 |
| 4.3.2 Procedimentos gerais para síntese das glicaminas | 40 |
| 4.3.3 Procedimentos gerais para síntese de derivados arilpirrólicos | 42 |
| 4.3.4 Otimização da síntese e cálculos de rendimentos | 42 |
| 4.4 PURIFICAÇÃO | 43 |
| 4.4.1 Extração | 43 |
| 4.4.2 Filtração | 43 |
| 4.4.3 Cristalização | 43 |
| 4.4.4 Cromatografia em sílica | 43 |
| 4.4.5 Cromatografia de troca iônica | 44 |
| 4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE SÍNTESE | 44 |
| 4.5.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) | 44 |
| 4.5.2 Espectrometria de massas | 44 |
| 4.5.3 Determinação do poder rotatório específico | 45 |
| 4.6 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA | 45 |
| 4.6.1 Acúmulo de mio-inositol fosfato (IP1) | 45 |
| 4.6.2 Competição com radioligante | 46 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO - PARTE I: GLICAMINAS | 47 |
| 5.1 ANÁLISE COMPUTACIONAL | 47 |
| 5.1.1 Estereoquímica e conformação dos derivados L01 e D01 | 47 |
| 5.1.2 Experimento de atracamento molecular | 51 |
| 5.1.3 Ligação com diferentes GPCRs | 54 |
| 5.1.4 Compostos glicídicos e o sítio alostérico dos M ₁ mAChRs | 58 |
| 5.2 ANÁLISE TEÓRICA DA VIABILIDADE DE FÁRMACOS (DRUGLIKENESS) E POTENCIAIS ALVOS MOLECULARES (TARGET PREDICTION) | 59 |
| 5.3 SÍNTESE | 63 |
| 5.3.1 Otimização da síntese dos intermediários-chave (glicaminas) | 63 |
| 5.3.2 Síntese dos derivados L01 e D01 | 73 |
| 5.3.3 Síntese dos derivados <i>N</i> -benzilados L24 , L25 e L26 | 76 |

| | |
|---|-----|
| 5.4 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS DERIVADOS N-BENZILADOS | 79 |
| 5.5 PROCEDIMENTOS SINTÉTICOS E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS | 81 |
| 5.5.1 β -D-Galactopiranosil-(1'→4)-3,6-anidro- α -L-galactitol (agarobiose, 1b) | 81 |
| 5.5.2 β -D-Galactopiranosil-(1'→4)-1-amino-1-desoxi-3,6-anidro- α -L-galactitol 3 | 82 |
| 5.5.3 β -D-Galactopiranosil-(1'→4)-1-(<i>N</i> -metilamino)-1-desoxi-3,6-anidro- α -L-galactitol 7 | 84 |
| 5.5.4 β -D-Galactopiranosil-(1'→4)-1-(<i>N,N</i> -dimetilamino)-1-desoxi-3,6-anidro- α -L-galactitol 8 | 86 |
| 5.5.5 1-(<i>N</i> -Metilamino)-1-desoxi-3,6-anidro- α -L-galactitol 9 ou (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2-[(<i>S</i>)-1-hidroxi-2-(metilamino)etil]tetra-hidrofuran-3,4-diol | 88 |
| 5.5.6 3,6-Anidro-L-galactitol 11 ou (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2-[(<i>S</i>)-1,2-dihidroxietil]tetrahidrofuran-3,4-diol | 90 |
| 5.5.7 2,5-Anidro-L-lixitol 12 ou (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2-(di-hidroximetil)tetra-hidrofuran-3,4-diol | 92 |
| 5.5.8 1-(<i>N</i> -Metilamino)-1-desoxi-2,5-anidro-L-lixitol 13 ou (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2-[(metilamino)metil]tetrahidrofuran-3,4-diol | 94 |
| 5.5.9 1-(<i>N</i> -metilamino)-1-desoxi-3,6-anidro- α -D-galactitol 15 ou (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-2-[(<i>R</i>)-1-hidroxi-2-(metilamino)etil]tetra-hidrofuran-3,4-diol | 96 |
| 5.5.10 1-(<i>N,N,N</i> -Trimetilamino)-1-desoxi-3,6-anidro- α -L-galactitol L01 ou (<i>S</i>)-2-((2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-3,4-dihidroxitetra-hidrofuran-2-il)-2-hidroxi- <i>N,N,N</i> -trimetiletanamínio | 98 |
| 5.5.11 1-(<i>N,N,N</i> -Trimetilamino)-1-desoxi-3,6-anidro- α -D-galactitol D01 ou (<i>R</i>)-2-((2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-3,4-dihidroxitetra-hidrofuran-2-il)-2-hidroxi- <i>N,N,N</i> -trimetiletanamínio | 100 |
| 5.5.12 1-(<i>N</i> -Benzil- <i>N</i> -metilamino)-1-desoxi-2,5-anidro-L-lixitol L24 ou (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2-[(benzil(metil)amino)metil]tetra-hidrofuran-3,4-diol | 102 |
| 5.5.13 1-(<i>N</i> -benzil- <i>N</i> -metilamino)-1-desoxi-3,6-anidro- α -L-galactitol L25 ou (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2-[(<i>S</i>)-2-[benzil(metil)amino]-1-hidroxietil]tetra-hidrofuran-3,4-diol | 104 |
| 5.5.14 β -D-Galactopiranosil-(1'→4)-1-(<i>N</i> -benzil- <i>N</i> -metilamino)-1-desoxi-3,6-anidro- α -L-galactitol L26 | 105 |
| 5.5.15 β -D-Galactopiranosil-(1'→4)-1-(<i>N,N</i> -dibenzil- <i>N</i> -metilamônio)-1-desoxi-3,6-anidro- α -L-galactitol subL26 | 106 |
| 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO - PARTE II: ARILPIRRÓIS | 107 |
| Synthesis and Pharmacological Evaluation of Heterocyclic Carboxamides: Positive Allosteric Modulators of the M ₁ Muscarinic Acetylcholine Receptor with Weak Agonist Activity and Diverse Modulatory Profiles | 108 |
| ABSTRACT | 109 |
| INTRODUCTION | 110 |
| RESULTS AND DISCUSSION | 114 |
| Chemistry | 114 |
| Pharmacology | 120 |
| CONCLUSIONS | 130 |
| EXPERIMENTAL SECTION | 132 |
| Chemistry | 132 |
| Pharmacology | 156 |
| CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS | 160 |
| REFERÊNCIAS | 163 |
| ANEXOS | 170 |
| Anexo 1: Passo a passo dos experimentos de atracamento | 171 |
| Anexo 2: Resultados da busca de possíveis alvos moleculares utilizando o programa SwissTargetPrediction | 181 |
| Anexo 3: Estrutura química dos derivados arilpirrólicos sintetizados durante o estágio doutoral sanduíche em parceria com a Monash University | 185 |
| Anexo 4: Supporting Information "Synthesis and Pharmacological Evaluation of Heterocyclic Carboxamides: Positive Allosteric Modulators of the M ₁ Muscarinic Acetylcholine Receptor with Weak Agonist Activity and Diverse Modulatory Profiles" | 186 |
| Anexo 5: Artigo "Aqueous semisynthesis of C-glycoside glycamines from agarose" In: Beilstein J. Org. Chem. 2017, 13, 1222–1229. | 188 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 RECEPTORES MUSCARÍNICOS E LIGANTES ORTOSTÉRICOS

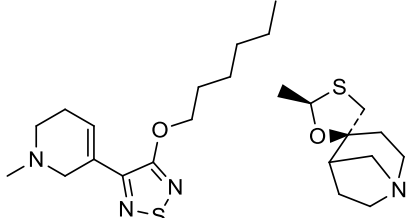
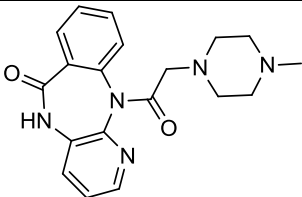
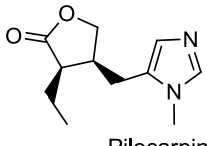
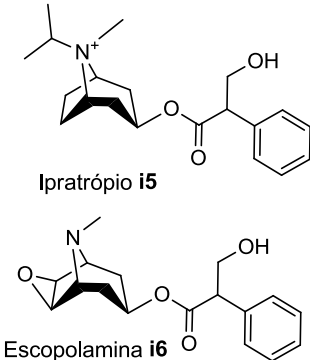
Os receptores muscarínicos ou mAChR (*muscarinic acetylcholine receptors*) são responsáveis pela geração de sinais celulares e respostas fisiológicas em tecidos inervados pelo sistema nervoso autônomo, respondendo ao neurotransmissor endógeno acetilcolina (ACh), o primeiro neurotransmissor a ser identificado na história (LOEWI, 1921). Esses receptores foram nomeados muscarínicos devido ao fato de que a molécula de muscarina (presente no cogumelo *Amanita muscaria*) ativa seletivamente estes receptores.

Ao passo que a ACh estimula a secreção das glândulas salivares e sudoríparas, secreção e contração no intestino e constrição das vias aéreas no trato respiratório, essa substância reduz a frequência e tônus na contração cardíaca e causa relaxamento de músculos liso nos vasos sanguíneos. Esta vasta gama de ações fisiológicas tornou evidente que a ação da ACh não poderia ser mediada por apenas um tipo de receptor muscarínico. Pesquisas sobre receptores colinérgicos ganharam força na década de 80, uma vez que tais receptores mostraram-se potenciais alvos para fármacos. O resultado destas pesquisas foi a descoberta de vários subtipos de receptores muscarínicos (CAULFIELD; BIRDSALL, 1998; EGMEN, 2006; GOYAL, 1989). São descritos cinco diferentes subtipos de receptores, M₁–M₅ que podem ser subdivididos em duas classes: M₁, M₃ e M₅ são receptores ditos estimulatórios (com seletividade pela proteína G α_q) e os subtipos M₂ e M₄ são ditos inibitórios (tendo seletividade pela proteína G α_i).

Os receptores M₁ ou “neurais” são encontrados principalmente em neurônios do SNC no hipocampo e nas células parietais do estômago. Sua função fisiológica mais explorada está relacionada a funções cognitivas, como de aprendizado e memória, sendo um importante alvo para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como por exemplo, a doença de Alzheimer (DA) e a esquizofrenia. O desenvolvimento de agonistas seletivos para o subtipo M₁ dos receptores muscarínicos é uma tarefa perseguida há mais de 30 anos (CLADER; WANG, 2005). O sítio ortostérico do receptor encontra-se no primeiro terço superior das hélices transmembranas. Os resíduos de aminoácidos desse sítio são conservados em todos os cinco subtipos de receptores muscarínicos M₁–M₅, fazendo com que seja virtualmente impossível o desenvolvimento de ligantes seletivos. Ainda assim, algumas moléculas apresentam seletividade parcial para estes receptores, como por exemplo, a xanomelina **i1** e a cevimelina **i2** (Quadro 1). Essas substâncias apenas apresentam uma preferência aumentada por este subtipo de receptor e constantes de dissociação mais lentas. Assim, os seus efeitos poderiam ser semelhantes a uma

substância seletiva, porém elas não o são verdadeiramente (CLADER; WANG, 2005; JIANG et al., 2014). Apesar do enorme esforço para o desenvolvimento de moléculas seletivas para os receptores M_1 , nenhuma delas chegou ao mercado com a finalidade almejada (o tratamento do déficit cognitivo na DA). Isto devido a sua baixa potência, propriedades físico-químicas não ideais para penetração na BHE e efeitos adversos constatados em estudos pré-clínicos e clínicos. Como exemplo de fármaco que tem como alvo o M_1 mAChR cita-se a pirenzepina **i3**, que é um antagonista (não seletivo) utilizado clinicamente para o tratamento de úlcera péptica (HULME; BIRDSALL; BUCKEY, 1990; RANG et al., 2008c).

Quadro 1: Estrutura química e usos clínicos de fármacos atuantes nos receptores muscarínicos

| Receptor | Fármacos | Tipo de ação e usos clínicos |
|-------------|---|--|
| M_1 mAChR |  <p>Xanomelina i1 Cevimelina i2</p> | <p><i>Agonistas não seletivos</i></p> <p>- não possuem uso clínico;</p> |
| |  <p>Pirenzepina i3</p> | <p><i>Antagonista não seletivo</i></p> <p>- para úlcera péptica;</p> |
| M_3 mAChR |  <p>Pilocarpina i4</p> | <p><i>Agonista não seletivo</i></p> <p>- miótico;</p> |
| |  <p>Ipratrópio i5 Escopolamina i6</p> | <p><i>Antagonistas não seletivos</i></p> <p>- DPOC; - antiespasmódico;</p> |

Fonte: RANG et al., 2008c, JIANG et al., 2014. mAChR: receptor muscarínico;

Os receptores M_3 (“glandulares”) regulam importantes funções fisiológicas no organismo. Eles medeiam efeitos excitatórios, ou seja, estimulação das secreções

(salivares, sudoríparas, brônquicas) e contração do músculo liso das vísceras e vias respiratórias (CAULFIELD; BIRDSALL, 1998). Semelhante ao que ocorre para os demais subtipos, não existem fármacos seletivos para o receptor M_3 -muscarínico. Apesar disso, ligantes muscarínicos não seletivos, tendo como alvo este subtipo, são amplamente empregados terapeuticamente (KRUSE et al., 2012).

Como exemplos de agonistas M_3 empregados na medicina, destacam-se a pilocarpina **i4** (Quadro 1) e betanecol. O primeiro encontra o seu emprego para o tratamento de glaucoma (colírio com efeito miótico - contração da pupila) e também para o tratamento de xerostomia grave (aumento da secreção das glândulas salivares). O betanecol é empregado para tratamentos de retenção urinária, especialmente em casos de neuropatias que geram a falta de tônus deste órgão. Os efeitos tóxicos de medicamentos colinérgicos assemelham-se àqueles observados em intoxicações pelo alcaloide muscarina, incluindo salivação, sudorese, espasmos gastrointestinais, diarreia, poliúria, visão borrada devido à miose, broncoconstrição e bradicardia (CAULFIELD; BIRDSALL, 1998; GOYAL, 1989; HULME; BIRDSALL; BUCKEY, 1990). Não obstante, o emprego de antagonistas M_3 é uma estratégia consolidada para o tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Genericamente denominados de anticolinérgicos, os fármacos tiotrópio e ipratrópio **i5** (Quadro 1) são os principais exemplos do uso desta classe de medicamentos, não subtipo-seletiva, para o tratamento da DPOC. Por bloquear os efeitos da ACh, eles geram broncodilatação e redução de secreções nas vias respiratórias. Outros anticolinérgicos de destaque são a atropina (usado principalmente na forma de colírio midriático – dilatador da pupila), a darifenacina (para o tratamento de bexiga hiperativa e incontinência urinária) e a escopolamina **i6** (antiespasmódico). Os principais efeitos adversos dos anticolinérgicos estão associados a ação intrínseca destes fármacos e incluem boca seca e constipação (efeitos associados ao bloqueio dos receptores M_3) e ainda taquicardia (efeito associado ao bloqueio dos receptores M_2 no músculo cardíaco).

Tendo em vista os efeitos fisiológicos mediados por esses receptores, a busca por análogos que possam apresentar seletividade para um determinado subtipo de mAChR e, portanto, a obtenção de moléculas terapeuticamente úteis é um assunto recorrente na literatura e um desafio perseguido a mais de 30 anos (CLADER; WANG, 2005). A dificuldade de se elaborar compostos seletivos deve-se à grande similaridade estrutural entre os sítios ortostéricos dos cinco diferentes subtipos de receptores muscarínicos (EGLIN, 2006). Isto levou os pesquisadores a buscar alternativas para solucionar este problema, o que culminou na identificação de sítios alostéricos mais variáveis entre os diferentes subtipos de mAChR, especialmente úteis para o desenvolvimento de ligantes moduladores alostéricos para os receptores do subtipo M_1 .

1.2 MODULADORES ALOSTÉRICOS DOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS

A classe de compostos que pode apresentar alta seletividade subtipo-específica para receptores muscarínicos e, portanto, que pode ter maior potencial terapêutico, são os moduladores positivos alostéricos ou PAMs (do inglês *Positive Allosteric Modulators*). Essas substâncias são capazes de interagir com um sítio alostérico nos receptores muscarínicos o qual é distinto do sítio de ligação da ACh (sítio ortostérico). Esse sítio de ligação encontra-se na porção extracelular do receptor, logo acima do sítio ortostérico, e inclui aa localizados nas TM1, TM2, TM3 e TM7 e ainda os aminoácidos das alças extracelulares ECL2, ECL3 (THAL et al., 2016). Diferente do que ocorre com os aa do sítio ortostérico, que são idênticos ou muito conservados dentre os cinco subtipos dos receptores muscarínicos (M_1 - M_5), os aa do sítio alostérico são mais variados dentre os diferentes subtipos do receptor. Sendo assim, alguns compostos apresentam seletividade para um determinado subtipo de receptores muscarínico (Figura 1).

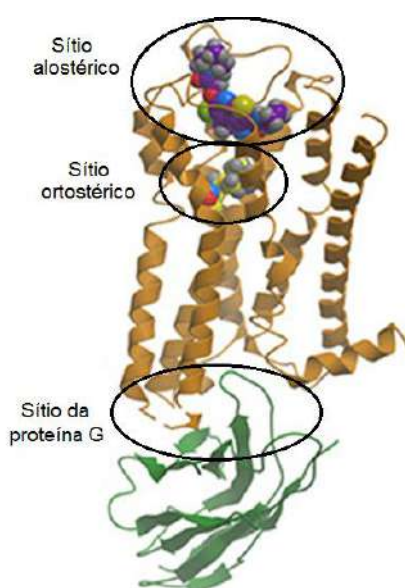


Figura 1: Sítios de ligação no receptor muscarínico M_1 . Fonte: adaptado de HAGA et al., 2012.

Atualmente, um dos assuntos em voga na área de planejamento de fármacos envolve o desenvolvimento e o estudo da interação de moduladores alostéricos com os receptores muscarínicos do subtipo M_1 . Inúmeros estudos buscam a elucidação dos mecanismos de ação ao nível molecular e a comprovação da utilidade terapêutica destes compostos para o tratamento da DA (ABDUL-RIDHA et al., 2014a, 2014b; DAVIE et al., 2014; DAVIE; CHRISTOPOULOS; SCAMMELLS, 2013; DAVOREN et al., 2016a; ESPINOZA-FONSECA; TRUJILLO-FERRARA, 2005; KRUSE et al., 2013; MISTRY et al., 2013, 2015, 2016; VALANT et al., 2008; YEATMAN et al., 2014).

A ativação seletiva desses receptores é desejada para o tratamento de sintomas de doenças que envolvem um déficit colinérgico, como é o caso da DA. Nessa condição ocorre uma redução significativa dos níveis de ACh. Assim, compostos capazes de potencializar a ação desse neurotransmissor são capazes de melhorar a cognição e memória dos pacientes (KUDUK et al., 2010; POTTER, 2010). Os fármacos disponíveis para o tratamento da DA são os inibidores da acetilcolinesterase, os quais aumentam a concentração da ACh na fenda sináptica. Contudo, essas substâncias não são ideais para o tratamento pois são inespecíficas. O aumento indiscriminado dos níveis de ACh no organismo gera uma série de efeitos adversos relacionados a ativação dos diferentes subtipos dos receptores muscarínicos, como por exemplo, cólicas e diarreia devido à contração da musculatura do TGI (respostas mediadas pelos receptores M_3) e bradicardia devido a ação inibitória do receptor M_2 na musculatura cardíaca. Os PAMs seletivos para os receptores M_1 representam, portanto, uma excelente estratégia para evitar esses efeitos indesejados.

A partir de 2013, achados a respeito da relação estrutura-atividade (REA) de ligantes alostéricos do receptor muscarínico M_1 foram publicados (ABDUL-RIDHA et al., 2014a; DAVOREN et al., 2016a; MISTRY et al., 2013, 2015, 2016). Devido ao fato de se observarem inconsistências entre os resultados de afinidade pelo receptor e de atividade exibida pelos moduladores, uma nova abordagem de ensaios farmacológicos foi proposta para avaliação dos PAMs. Nessa abordagem são medidos a afinidade do ligante (pK_B), a eficácia intrínseca (τ_B), e a cooperatividade com a ACh (de ligação – α – ou funcional – β), conforme Figura 2. Essa estratégia permitiu uma avaliação mais criteriosa, racional e assertiva da REA e contribuiu para o aumento exponencial do número de candidatos a fármacos.

A avaliação do perfil alostérico de PAMs seletivos para os receptores muscarínicos M_1 permitiu a melhor compreensão da atividade destes compostos (DAVOREN et al., 2016a, 2016b, 2017, MISTRY et al., 2015, 2016; ROOK et al., 2017). Nesses estudos verificou-se que alguns compostos são capazes de gerar resposta intracelular mesmo na ausência do estímulo endógeno (ligante ortostérico), sendo denominados de “agonistas alostéricos”. Muitos compostos foram otimizados como agonistas alostéricos potentes, pois inicialmente acreditava-se que a seletividade dos compostos seria o fator mais importante, e o balanço entre a atividade intrínseca e a atividade puramente modulatória dos PAMS não era explorada. Contudo, no início de 2016, começaram a surgir evidências de que os agonistas alostéricos não seriam ideais para o tratamento por gerarem efeitos adversos graves *in vivo*, como por exemplo convulsão (ALT et al., 2016; DAVOREN et al., 2017; ROOK et al., 2017). A hipótese mais aceita atualmente é de que os moduladores alostéricos ideais não devem apresentar atividade intrínseca (τ_B) exacerbada e sim apresentar proeminente cooperatividade ($\alpha\beta$) com o ligante endógeno ACh. Assim, a resposta intracelular seria

gerada apenas no local e momento em que o neurotransmissor é liberado, preservando a regulação fisiológica e reduzindo as chances de efeitos adversos (ALT et al., 2016).

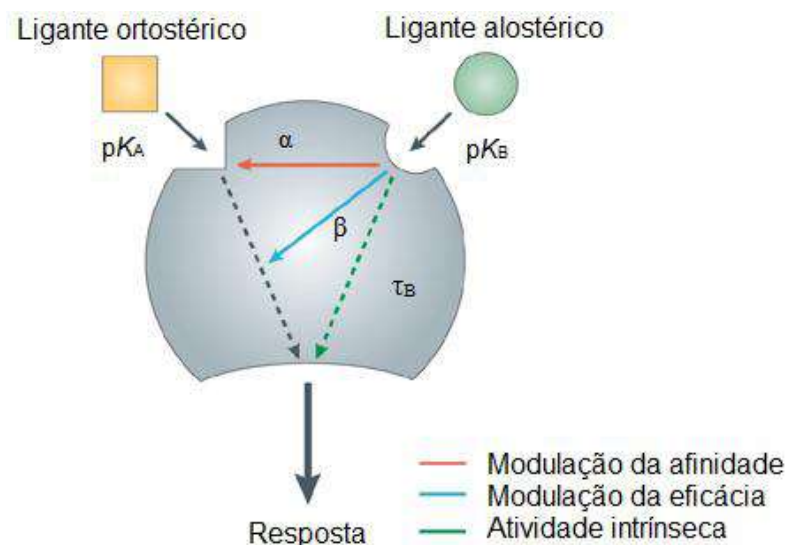


Figura 2: Componentes do mecanismo de ação de ligantes alostéricos. Fonte: adaptado de CONN; CHRISTOPOULOS; LINDSLEY, 2009

Atualmente, os estudos da REA de PAMs dos receptores M_1 têm por objetivo identificar as características estruturais dos compostos que contribuem para modulação da ligação e eficácia da ACh, mantendo baixos níveis de atividade intrínseca. O composto BQCA serviu de modelo para inúmeros estudos devido a sua alta seletividade para o sítio alostérico do receptor muscarínico do subtipo M_1 . Assim surgiram nos últimos anos inúmeras entidades químicas estruturalmente semelhantes ao BQCA, capazes de agir como PAMs. O surgimento desses novos compostos e o estudo da REA permitiram racionalizar como as modificações químicas na estrutura dos ligantes influenciam a atividade alostérica. A Figura 3 resume quais porções da molécula BQCA podem ser alteradas para modificar os parâmetros alostéricos específicos. Na Figura 4 podem ser visualizados alguns exemplos representativos de compostos relacionados à otimização estrutural realizada nos últimos anos. O estudo de derivados arilpirrólicos como moduladores dos receptores M_1 foi inspirado no trabalho desenvolvido pela Pfizer que resultou no derivados PF-06764427 (DAVOREN et al., 2016a). Esse composto apresentou afinidade e seletividade pelo receptor alvo e propriedades físico-químicas adequadas para permeação da BHE, porém apresentou atividade intrínseca exacerbada e efeitos adversos *in vivo* (DAVOREN et al., 2016a; ROOK et al., 2017).

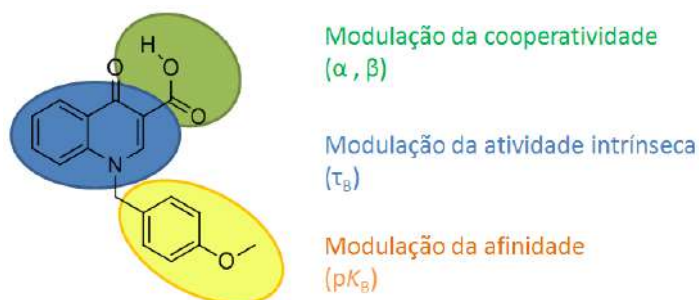


Figura 3: Regiões da molécula modelo BQCA e sua REA. Fonte: MISTRY et al., 2013

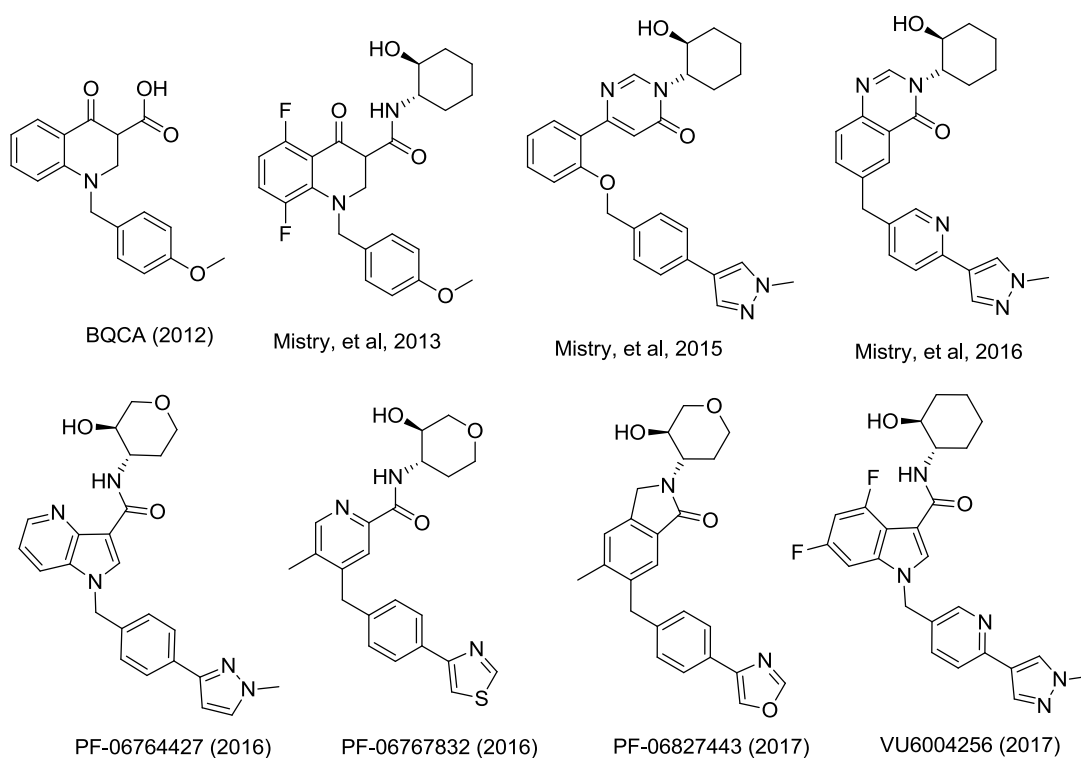


Figura 4: Moduladores alostéricos representativos no estudo da REA. Fonte: DAVOREN et al., 2016a, 2016b, 2017; KUDUK et al., 2010; MISTRY et al., 2013, 2015, 2016; ROOK et al., 2017

O desenvolvimento de novas substâncias úteis para o tratamento dos sintomas observados na DA é um tema discutido e pesquisado intensamente devido à falta de estratégias terapêuticas disponíveis para o tratamento dessa doença agravando-se ainda pelo aumento da prevalência da enfermidade decorrente do envelhecimento da população (PRINCE; JACKSON, 2009).

1.3 VISÃO GERAL

Nesse trabalho foram desenvolvidos compostos seguindo duas abordagens distintas: 1) a síntese análogos muscarínicos potenciais ligantes ortostéricos dos mAChR e 2) de moduladores alostéricos desses receptores. Ambas as classes de compostos apresentam potencial terapêutico, a primeira como antiespasmódico ou para o tratamento da DPOC, por exemplo, e a segunda para o tratamento da DA. Foram empregados diferentes materiais de partida para cada uma das abordagens, sendo blocos estruturais de agaranas e ácidos orgânicos arrilpirrólicos, respectivamente. Ligantes conhecidos serviram de base para as modificações químicas propostas em cada um dos casos. A estrutura da (+)-muscarina (**m1**) serviu de base para elaboração de derivados glicídicos na interação com o sítio ortostérico. Já para elaboração dos moduladores alostéricos a carboxamida PF-06764427 (**p1**), desenvolvida pela Pfizer, foi a molécula de partida. Foram ainda utilizados experimentos de atracamento molecular para guiar a seleção de compostos no caso dos derivados glicídicos. Além dos receptor muscarínicos do subtipo M₃, foram testados outros receptores da classe dos GPCRs (receptores acoplados à proteína G) sendo eles, os receptores β_2 -adrenérgico e H₁ histaminérgico para interação com as glicaminas propostas nesse trabalho. Já no caso dos derivados arrilpirrólicos, foram empregados ensaios *in vitro* para o estudo do perfil farmacológico dos compostos e também para guiar otimizações das moléculas. O fluxograma a seguir (Figura 5) resume a abrangência do trabalho e na Figura 6 estão demonstradas as estruturas de ligantes dos mAChR conhecidos (**m1** ortostérico e **p1** alostéricos) e algum derivados propostos nesse trabalho (**L01**, **D01**, **15d**, **24e**).

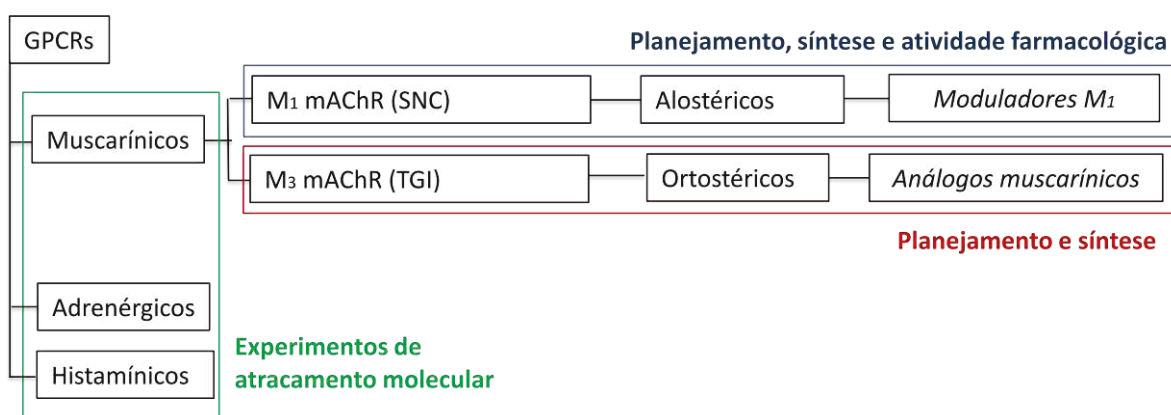


Figura 5: Fluxograma da abrangência do trabalho.

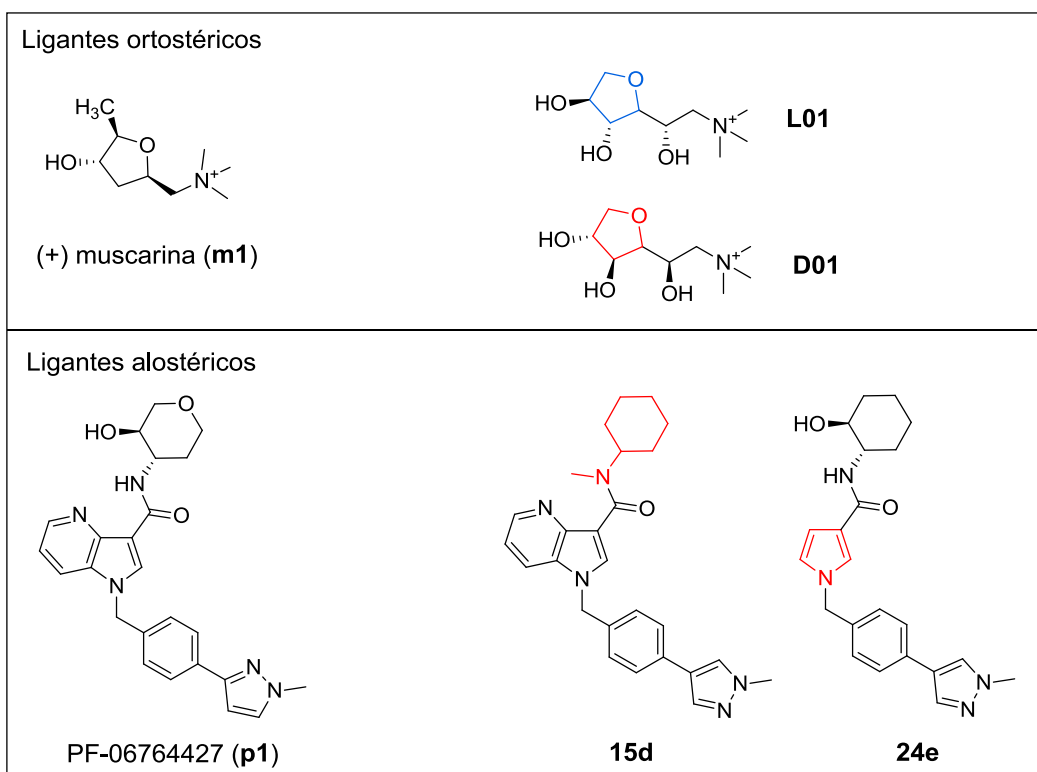


Figura 6: Ligantes conhecidos dos mAChR (à esquerda) e derivados propostos no trabalho (à direita).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Síntetizar compostos ativos, candidatos á fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer, tendo como alvo molecular os receptores muscarínicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Propor novos compostos, com base na relação estrutura-atividade já estabelecida na literatura, plausível para utilização da L- e D-3,6-anidrogactose, proveniente de agaranas e carragenanas, como materiais de partida para síntese de ligantes ortostéricos dos receptores muscarínicos;
- Propor novos compostos, moduladores alostéricos dos receptores muscarínicos do subtipo M₁, a partir de arilpirróis;
- Realizar estudos de atracamento molecular para seleção de compostos e avaliação de aspectos energéticos e estruturais da interação receptor-ligante;
- Realizar a otimização das etapas sintéticas e de purificação para obtenção dos compostos de interesse;
- Realizar a avaliação farmacológica *in vitro* das moléculas obtidas por síntese e avaliar a relação estrutura-atividade;
- Propor derivados glicídicos com especificidade para diferentes GPCRs, β_2 -adrenérgico (AR) e H₁ histaminérgico (HR) através de experimentos de atracamento molecular;

3 REVISÃO

3.1 RECEPTORES ACOPLADOS À PROTEÍNA G (GPCRs)

3.1.1 Importância e aspectos históricos

Receptores acoplados à proteína G ou GPCRs (do inglês, *G protein-coupled receptors*) constituem a maior família de receptores presentes na superfície celular, sendo mais de 800 genes os que codificam para este tipo de receptor. Eles estão envolvidos em diversos processos fisiológicos de sinalização celular e, por isso, são alvos para o planejamento de substâncias ativas. Estima-se que cerca de 45% de todos os fármacos aprovados e 70% de todos os fármacos em desenvolvimento tenham como alvo molecular um GPCR (HAUSER et al., 2017; KATRITCH; CHEREZOV; STEVENS, 2013).

Apesar de alguns eventos fisiológicos decorrentes da ativação ou inativação destes receptores já serem conhecidos há tempo pelos farmacologistas, a elucidação estrutural detalhada destes receptores e a compreensão do mecanismo de ativação dos mesmos só foi alcançada recentemente. O primeiro GPCR humano a ser sequenciado e clonado foi o receptor β_2 -adrenérgico, em 1986, pelo grupo de pesquisa liderado pelo professor Robert Lefkowitz (LEFKOWITZ, 2000; NELSON; COX, 2005). A partir daí, descobriu-se uma infinidade de sequências homólogas, porém com grandes diferenças quanto à sua função. Apesar da sequência e estrutura primária proteica de vários destes receptores terem sido elucidadas, pouquíssimas informações sobre a estrutura tridimensional e os mecanismos moleculares de ativação destes receptores eram conhecidas até 2012.

No ano de 2000, foi descrito pela primeira vez estrutura cristalina de um GPCR de mamífero, especificamente da proteína bovina rodopsina (receptor de luz da retina) (PALCZEWSKI et al., 2000). Por apresentar alto grau de homologia com diversos GPCRs humanos, por ser expressa em grandes quantidades na retina e por apresentar uma estrutura surpreendentemente estável, esta proteína serviu de modelo para os estudos de GPCR por algum tempo.

Somente em 2007 o grupo de pesquisa liderado por Brian Kobilka publicou pela primeira vez a estrutura cristalina de alta resolução de um receptor acoplado a proteína G humano, superando as dificuldades de estabilização e cristalização desta estrutura (BUCHEN, 2011; RASMUSSEN et al., 2007). Sua técnica (e adaptações da mesma) tem sido utilizada para a caracterização estrutural de vários outros receptores desta família, gerando um crescimento exponencial nesta área do conhecimento (SHONBERG et al., 2015; THAL et al., 2016).

Em 2012, Lefkowitz e Kobilka foram laureados com o prêmio Nobel de Química por suas contribuições no estudo dos receptores acoplados à proteína G. Suas descobertas contribuíram para a compreensão dos processos de sinalização ao nível estrutural e molecular, dos eventos bioquímicos e fisiológicos e da estrutura tridimensional dos sítios de ligação de vários receptores desta família. Estes conhecimentos foram essenciais para o desenvolvimento de diversas áreas da ciência, especialmente para a área de química medicinal e no desenvolvimento de novos fármacos.

3.1.2 Estrutura e mecanismos de ativação

Apesar da enorme diversidade de funções e eventos biológicos mediados pelos diferentes tipos de receptores, os GPCRs compartilham uma estrutura comum, sendo caracterizados por uma única cadeia polipeptídica com sete α -hélices transmembrana (Figura 7) e domínio *N*-terminal extracelular. As porções extracelulares frequentemente aparecem glicosiladas (KATRITCH; CHEREZOV; STEVENS, 2013; LEFKOWITZ, 2000; NELSON; COX, 2005).

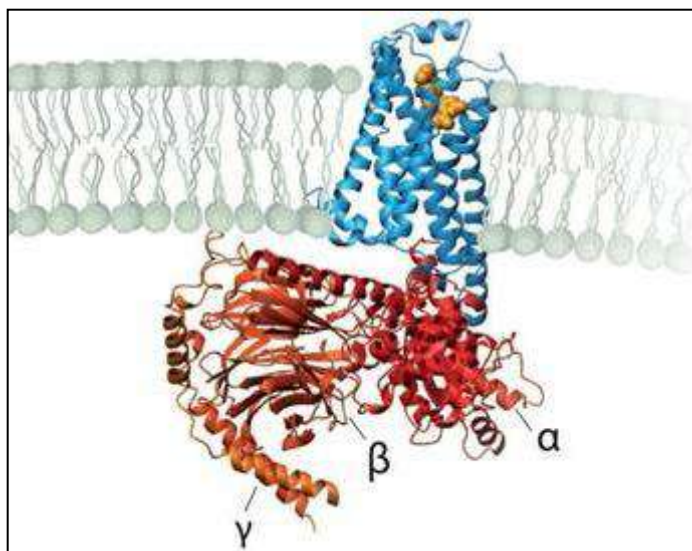


Figura 7: Estrutura proteica genérica de um GPCR. Em azul o receptor hepta-helicoidal transmembrana e em vermelho e laranja a proteína G (trímero $\alpha\beta\gamma$) ligada não covalentemente à porção intracelular do receptor. Fonte: adaptado de KATRITCH; CHEREZOV; STEVENS, 2013.

Esta superfamília de receptores pode ser dividida em cinco diferentes classes, dependendo da sequência de aminoácidos e do tamanho do domínio *N*-terminal extracelular. As classes A (família da rodopsina), B (família dos receptores de secretina/glucagon) e C (família do receptor metabotrópico de glutamato) são as mais

conhecidas (RANG et al., 2008a). Apesar de todos os GPCRs serem caracterizados por sete α -hélices transmembrana, as variações nas alças extracelulares e cadeias laterais de aminoácidos criam uma grande variedade de receptores com diferentes tamanhos, formatos e diferenças nas propriedades químicas e eletrostáticas do sítio de ligação. As diferentes classes destes receptores compartilham apenas uma pequena identidade na sequência de aminoácidos (SI, do inglês *sequence identity*). Assim, os receptores apresentam maior homologia entre aqueles pertencentes à mesma classe (SI $\geq 30\%$) e distinguem-se em maior grau entre receptores de classes diferentes (HAUSER et al., 2017; KATRITCH; CHEREZOV; STEVENS, 2013)

Algumas subclasses de receptores apresentam diferentes subtipos com alto grau de identidade (SI $\geq 80\%$) e frequentemente possuem um mesmo ligante endógeno comum. Isso ocorre devido a uma região muito conservada na sequência de aminoácidos que compõe o sítio de ligação na porção transmembrana. A maior diversidade estrutural entre subtipos de receptores ocorre na região das alças extracelulares. Esta região pode apresentar um repertório diverso de estruturas secundárias e padrões distintos de ligações dissulfeto (HAUSER et al., 2017). A Classe A, por exemplo, ou família da rodopsina, inclui uma subclasse de receptores que ligam-se à pequenas moléculas aminadas (incluindo os receptores muscarínicos, adrenérgicos e histaminérgico, entre outros). Os receptores desta subclasse possuem, por sua vez, diferentes subtipos. Assim os receptores muscarínicos, apresentam os subtipos M_1 , M_2 , M_3 , M_4 e M_5 , todos capazes de gerar respostas celulares frente às moléculas de ACh e muscarina (YEATMAN et al., 2014). Os receptores adrenérgicos possuem os subtipos α_1 , α_2 , β_1 , β_2 e β_3 , capazes de ligar-se às moléculas de epinefrina e norepinefrina (BRUECKNER et al., 2013). Os receptores histaminérgicos possuem os subtipos H_1 , H_2 , H_3 e H_4 , todos capazes de responder à presença do ligante endógeno histamina (GHONEIM et al., 2006).

Os GPCRs exercem sua função de sinalização através da interação com a proteína G (proteína de ligação a um nucleotídeo de guanósina). Esta proteína consiste em três subunidades: α , β e γ (Figura 7), que no estado de repouso constituem um trímero ($\alpha\beta\gamma$), não ligado covalentemente. Nucleotídeos de guanósina ligam-se à subunidade α , a qual apresenta atividade enzimática e catalisa a conversão de GTP (*guanosine triphosphate*) a GDP (*guanosine diphosphate*). Todas as subunidades da proteína G ficam ancoradas na membrana através de ácidos graxos ligadas à cadeia polipeptídica. Esse conjunto de proteínas é livremente difusível no plano da membrana, por conseguinte, um único conjunto de proteína G pode interagir com vários receptores e efetores diferentes (NELSON; COX, 2005).

Quando um GPCR é ativado por uma molécula agonista, ocorre uma mudança conformacional do receptor envolvendo o domínio citoplasmático, levando-o a adquirir uma

alta afinidade para $\alpha\beta\gamma$. Esta mudança envolve principalmente a movimentação e giro das hélices transmembrana TM5 e TM6 (Figura 8) (KATRITCH; CHEREZOV; STEVENS, 2013). Notoriamente, independentemente do tipo de GPCR ou ligante que promove o estímulo, esta mudança conformacional parece ser semelhante para todos os GPCRs. A associação de $\alpha\beta\gamma$ com o receptor força a dissociação do GDP ligado e sua substituição por GTP. Este evento, por sua vez, causa a dissociação do trímero da proteína G, liberando a subunidade α -GTP e $\beta\gamma$ (Figura 9). Estas são formas ativas da proteína G, que se difundem na membrana e podem se associar a diversas enzimas e canais iônicos, causando a ativação ou inibição do alvo. A especificidade e tipo de efeito biológico alcançado por diferentes tipos de GPCR se dá pela afinidade e complementariedade por diferentes subtipos de subunidade α (Figura 9). As variações moleculares da subunidade α de maior importância farmacológica incluem os subtipos α_s (estimula a enzima adenilato ciclase - AC) e aumenta a concentração de adenosina monofosfato cíclico - AMPc), α_i (inibe a enzima AC e diminui a concentração de AMPc) e α_q (estimula a atividade da fosfolipase C -PLC- e aumenta a concentração de inositol trifosfato e diacilglicerol) (Figura 9) (RANG et al., 2008a). O dímero $\beta\gamma$ também pode ativar efetores específicos durante o evento de dissociação da subunidade α -GTP (KATRITCH; CHEREZOV; STEVENS, 2013; RANG et al., 2008a; SUBBARAO, 2012). Este mecanismo de sinalização gera a amplificação do sinal, uma vez que um único complexo receptor-agonista pode ativar várias moléculas de proteína G. Além disso, as subunidades α -GTP podem permanecer ligadas às enzimas efetoras por tempo suficiente para produzir muitas moléculas de produto (denominado de segundo mensageiro; AMPc, IP₃, DAG).

Para concluir o ciclo, a subunidade α catalisa a hidrólise do GTP a GDP (atividade GTPase), o que promove o desligamento desta com os alvos e a reassociação com as subunidades $\beta\gamma$. O término da sinalização e restituição ao estado inicial dos receptores ocorre devido à ativação autolimitante (*feedback* negativo) de subunidades α -GTP ou regulação da atividade GTPase desta proteína influenciada por proteínas efetoras (proteínas reguladoras de genes, canais iônicos ou componentes de uma via metabólica, por exemplo). Pode ainda haver a fosforilação do próprio receptor por quinases específicas denominadas GRKs (do inglês, *G protein-coupled receptor kinases*). A fosforilação aumenta a afinidade dos receptores por uma proteína conhecida como β -arrestina. Esta induz a dessensibilização dos GPCRs e comanda a internalização destes receptores para a finalização da cascata de sinalização (KOPPEN; JAKOBS, 2004).

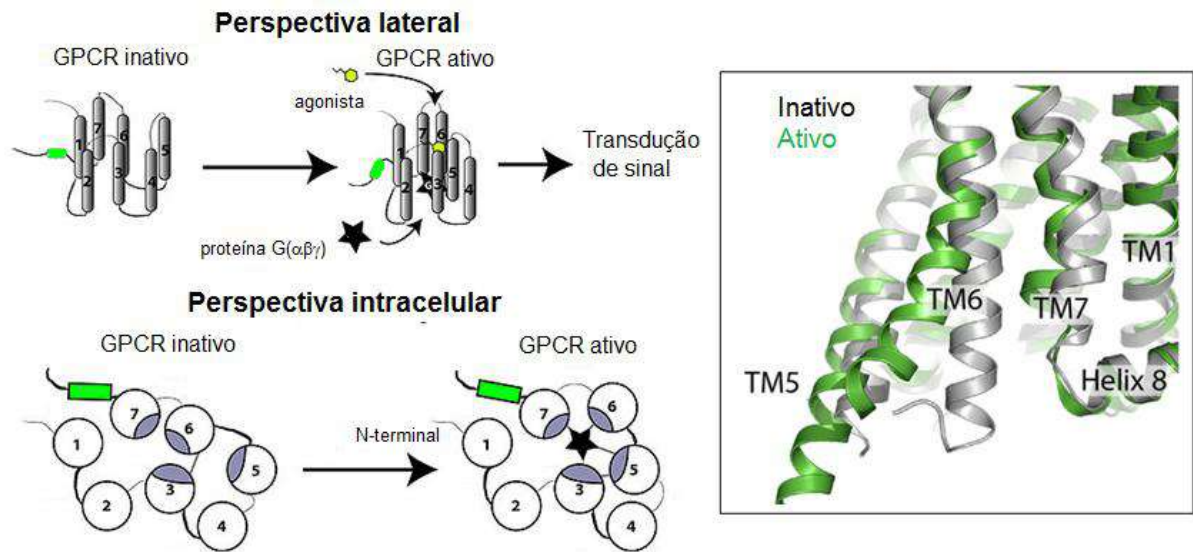


Figura 8: Representações esquemáticas das mudanças conformacionais que ocorrem em um GPCR genérico após a ligação com o agonista. Fonte: adaptado de KRUSE et al., 2013.

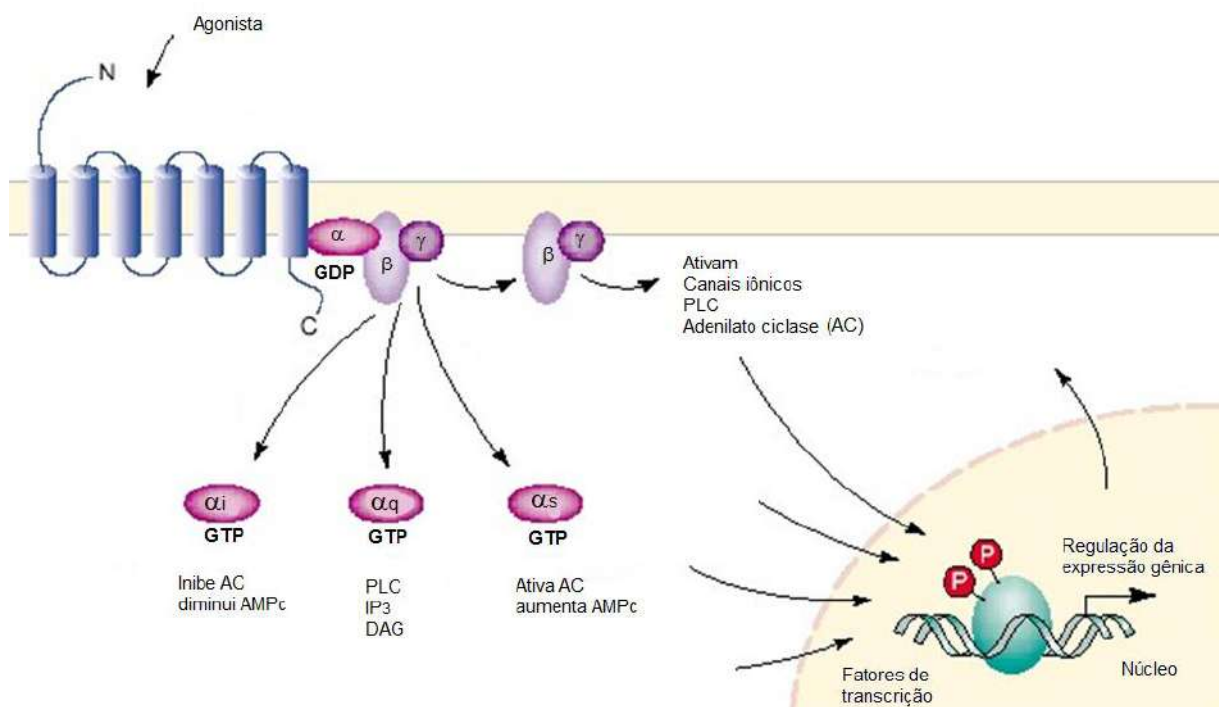


Figura 9: Representação esquemática da ativação de um GPCR genérico, subsequente ativação da proteína G e proteínas efetoras. Fonte: adaptado de SUBBARAO, 2012.

3.1.3 Funções fisiológicas

Os GPCRs estão envolvidos em uma grande variedade de processos fisiológicos. Eles encontram-se distribuídos por todos os tecidos do organismo e participam da regulação

da homeostase. Alguns exemplos da participação destes receptores em processos fisiológicos são citados a seguir (DORSAM; GUTKIND, 2007; KATRITCH; CHEREZOV; STEVENS, 2013; KINNAMON, 2012; PALCZEWSKI et al., 2000; SPEHR; MUNGER, 2009; YONA et al., 2008):

- a) Sentidos - Visão: a proteína rodopsina promove uma reação de fotoisomerização do 11-*cis*-retinal para 11-*trans*-retinal e com isso possibilita a transformação da radiação eletromagnética em sinais celulares; Paladar: GPCRs nas células gustativas são responsáveis por sinais celulares frente ao estímulo de substâncias doces ou amargas; Olfato: receptores olfatórios e receptores vomeronasais ligam-se a substâncias odoríferas e ferormônios;
- b) Comportamento, humor e cognição - receptores presentes no cérebro são regulados por diversos neurotransmissores, incluindo os receptores para serotonina, dopamina, norepinefrina, ACh, GABA, e glutamato;
- c) Imunidade e inflamação - receptores de citocinas ligam-se a mediadores de comunicação intercelular; receptores de histamina ligam-se a mediadores inflamatórios e estimulam certos tipos celulares a gerar uma resposta inflamatória;
- d) Sistema nervoso autônomo - o sistema nervoso simpático e parassimpático são regulados por receptores do tipo GPCR; estas vias regulam funções como pressão sanguínea, ritmo cardíaco e contração de musculatura lisa;
- e) Câncer - em alguns tipos de células cancerígenas, receptores do tipo GPCR estão envolvidos nos processos de metástase.

Para melhor compreensão e aprofundamento do papel dos receptores acoplados à proteína G no organismo, a seguir serão detalhados alguns dos GPCR escolhidos como alvo molecular dos ligantes desenvolvidos neste trabalho. No Quadro 1 são apresentados alguns exemplos de substâncias que tem um GPCR como alvo. Esses exemplos são detalhados no texto a seguir.

3.2 DERIVADOS DE CARBOIDRATOS

3.2.1 Polissacarídeos no desenvolvimento de compostos ativos

Polissacarídeos são polímeros de alta massa molar constituídos por dez ou mais unidades monossacarídicas (unidades de carboidratos) ligadas entre si por ligações glicosídicas. Estes polímeros podem ser constituídos por um único tipo de monômero (denominados de homopolissacarídeos) ou ainda por mais de um tipo de monossacarídeo (heteropolissacarídeos). Podem ainda adotar um arranjo linear ou ramificado dependendo

de como as unidades monossacarídicas estão ligadas entre si. A hidrólise destes materiais é uma fonte abundante e barata de oligo e monossacarídeos (ASPINALL, 1982).

O amido e o glicogênio (polímeros de reserva), a celulose e a quitina (polímeros estruturais) são os polissacarídeos encontrados em maior abundância na natureza. Além destas, muitas outras macromoléculas desta família apresentam grande importância econômica. Na indústria de alimentos e farmacêutica os principais polissacarídeos de interesse são as gomas (goma guar, goma xantana e goma arábica) (CHIVERO et al., 2015) empregadas principalmente como estabilizantes, espessantes e emulsificantes. A celulose também é de grande importância para estas indústrias, bem como para a indústria do papel e derivados. Na área de cosméticos e medicinal destacam-se o uso dos biopolímeros ácido hialurônico e heparina (PERSIN et al., 2011).

As pesquisas para descoberta de novos fármacos a partir de polissacarídeos nativos estão em plena expansão, em grande parte, influenciadas pelo notável sucesso do uso da heparina (principal agente anticoagulante empregado terapeuticamente). As principais frentes no desenvolvimento de fármacos baseados em carboidratos e glicoconjugados envolvem aspectos da glicogenômica e incluem pesquisas de vacinas, materiais biocompatíveis, agentes anti-inflamatórios, antivirais e antineoplásicos (KOELLER; WONG, 2000; PERSIN et al., 2011; SEEBERGER; WERZ, 2007).

3.2.2 Galactanas de algas vermelhas

Galactanas são polissacarídeos formados por unidades repetitivas de galactose. Uma das principais características que diferenciam as galactanas obtidas de algas vermelhas de outros polissacarídeos isolados de vegetais é a presença de unidades de 3,6-anidrogactose (3,6-AnGal).

Estes biopolímeros apresentam uma estrutura dissacarídica repetitiva constituída de unidades de (1→3)-β-D-galactopirranose (unidade A) e (1→4)-α-galactopirranose (unidade B). As galactanas são ainda classificadas de acordo com a estereoquímica das unidades B, podendo ser denominadas de agaranas (enantiômero-L) ou carragenanas (enantiômero-D) (Figura 10). Estas estruturas básicas e repetitivas das galactanas podem ainda apresentar modificações por diferentes tipos de substituintes, tais como os grupos sulfato, metila, carboxietilideno, entre outros (USOV, 1998).

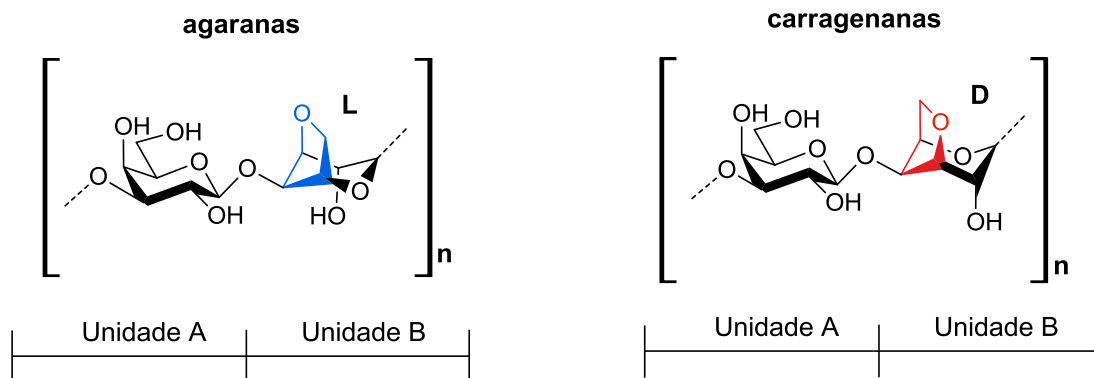


Figura 10: Estrutura química genérica de galactanas de algas vermelhas destacando-se o anel furanósídeo das unidades 3,6-anidrogactopirranose. Fonte: adaptado de DELATTRE; FENORADOSOA; MICHAUD, 2011.

Estes polissacarídeos são bastante explorados comercialmente. As agaranas são utilizadas para confecção de cápsulas, material para moldes dentários, base para cosméticos e como espessante pela indústria alimentícia. A agarose purificada neutra é utilizada em experimentação bioquímica como gel para eletroforese e cromatografia e como suporte para o cultivo de micro-organismos e células. As carragenanas são também utilizadas como estabilizantes de emulsão, espessantes e geleificantes (GONÇALVES et al., 2014; RENN, 1997).

O estudo de modificações químicas e a produção de blocos estruturais provenientes de galactanas é um assunto recorrentemente na literatura. No que diz respeito às agaranas especificamente, muitas atividades biológicas têm sido relatadas para agaro-oligossacarídeos (oligômeros formados por 3,6-L-AnGal e D-galactose) como, por exemplo, atividade anti-inflamatória, imunorreguladora e antitumoral, e estas atividades parecem estar relacionadas à presença dos anéis 3,6-AnGal nestas estruturas (CHEN; ZHENG; YAN, 2005; YUN et al., 2013). Já para as carragenanas, devido à presença de grupamentos sulfato em maiores quantidades quando comparados às agaranas, as principais atividades biológicas são as ações anticoagulante e antivirais destes polímeros e dos correspondentes oligossacarídeos e derivados (DE ARAÚJO et al., 2013; KOELLER; WONG, 2000; PATEL, 2012).

A produção de derivados glicídicos baseados na estrutura de oligo- e monossacarídeos provenientes de galactanas de algas vermelhas é um assunto recorrentemente abordado pelo grupo de pesquisa no qual o presente trabalho está inserido (grupo de Carboidratos do depto. de Bioquímica e SinHeGli – UFPR). Os estudos de GONÇALVES e colaboradores com alquil oligossacarídeos sulfatados para produção de compostos antivirais (GONÇALVES et al., 2007), DUCATTI e colaboradores com a produção de C-glicosil aldeídos (DUCATTI et al., 2009) e de ORSATO com intermediários

glicamínicos (ORSATO, 2007) forneceram conteúdos de base para o desenvolvimento do presente trabalho.

3.2.3 Síntese de análogos muscarínicos a partir de carboidratos

A síntese da (+)-muscarina propriamente dita, alguns de seus epímeros e outros derivados, a partir de carboidratos é um tema já abordado anteriormente. Neste contexto, podem-se citar dois exemplos relevantes relacionados ao emprego de monossacarídeos na síntese de análogos muscarínicos: a síntese de compostos com um grupo hidroxila adicional diretamente ligado ao anel tetra-hidrofurano em questão (denominados genericamente de derivados 3-hidroxi-muscarínicos) e a síntese de muscaronas (onde o grupo hidroxila do anel tetra-hidrofurano é substituído por uma carbonila) (Figura 11). Estes compostos foram inicialmente sintetizados com o intuito de atingir seletividade para algum dos subtipos de receptores muscarínicos, porém, apesar de serem biologicamente ativos, não obtiveram sucesso no que diz respeito à seletividade (DE AMICI et al., 1989; MANTEL et al., 1992; MANTEL et al., 1993; POPSAVIN et al., 1999, 2000).

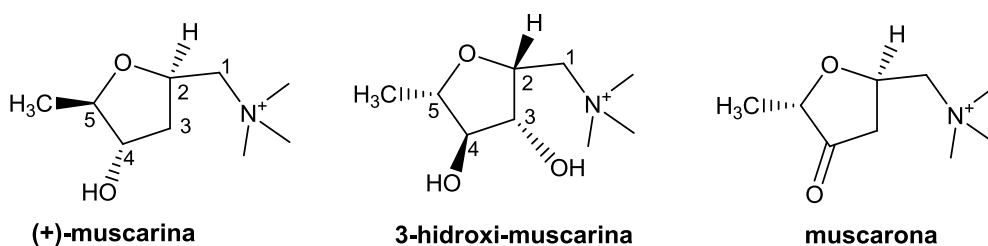


Figura 11: 3-Hidroxi-muscarina e muscarona obtidas sinteticamente a partir de monossacarídeos. Fonte: MANTEL et al., 1993; POPSAVIN et al., 1999.

3.3 ANÁLISE COMPUTACIONAL

O emprego de técnicas computacionais para a predição de compostos terapeuticamente promissores vem sendo bastante explorado nos últimos anos (GUEDES; MAGALHÃES; DARDENE, 2014; RODRÍGUEZ et al., 2015; SCHNEIDER; BÖHM, 2002). A elucidação estrutural em nível molecular de inúmeras proteínas, enzimas e receptores, e ainda, a elucidação do modo de ligação de ligantes endógenos e fármacos clássicos impulsionou o emprego de experimentos de atracamento molecular (no inglês, *docking*) para o planejamento e otimização de ligantes frente à análise da interação receptor-ligante. Estas técnicas são ferramenta úteis para a química medicinal e, em especial, para a síntese de fármacos, uma vez que possibilitam uma análise prévia rápida e a economia de recursos na elaboração de novas entidades químicas com alvos moleculares definidos.

A etapa de ligação entre um fármaco e seu alvo molecular proteico é um processo complexo por natureza. Fatores entrópicos e entálpicos influenciam nas interações formadas. Não obstante, a flexibilidade do ligante e da proteína, o efeito do ambiente proteico na distribuição de cargas do ligante e as interações que podem ocorrer com moléculas de água presentes no meio são aspectos que dificultam a descrição detalhada desse processo. A ideia geral contida nas técnicas de atracamento é a de gerar um leque de possibilidades do arranjo receptor-ligante e ordená-las por uma pontuação com base na estabilidade do complexo formado (SLIWOSKI et al., 2014). As características mais valiosas desse método de avaliação computacional são sua capacidade de reproduzir modos de ligação observados experimentalmente e sua capacidade em ordenar ligantes, através de pontuações teóricas, de acordo com os valores experimentais de atividade (por exemplo, EC_{50}) (GUEDES; MAGALHÃES; DARDENE, 2014; VERDONK et al., 2003).

De maneira geral, os programas de atracamento são formados pela combinação de dois componentes: um algoritmo de busca e uma função de pontuação (*score*). O algoritmo é utilizado na busca de possíveis modos de ligação e permite explorar os graus de liberdade translacional, rotacional e conformacional do ligante, bem como das ligações rotacionáveis na proteína. A função de pontuação é aplicada com o intuito de distinguir os modos de ligação teoricamente mais próximos aos que seriam encontrados experimentalmente dos demais resultados. Essas funções podem ser estabelecidas de acordo com campos de força de mecânica molecular, parâmetros empíricos de cálculos de energia ou mesmo de acordo com parâmetros denominados “*knowledge-based*” com dados extraídos de bases de dados alimentados por informações de complexos receptor-ligante em 3D (FERREIRA et al., 2015; GUEDES; MAGALHÃES; DARDENE, 2014).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANÁLISE COMPUTACIONAL

4.1.1 Estrutura tridimensional dos ligantes

Os modelos tridimensionais dos ligantes foram gerados e minimizados no programa Avogadro, empregando cálculos quanto-mecânicos, para a otimização estrutural e busca de conformações de menor energia. A estrutura do derivado **L01** C4-exo não foi minimizada, ou seja, não atingiu convergência para mínima energia durante a otimização estrutural. Durante os experimentos de atracamento, todas as ligações simples foram mantidas flexíveis (com giro de 360° permitido) enquanto que a torção do anel tetra-hidrofurano foi mantida rígida como envelope em C4 (conformação C4-*endo*) para os derivados **L01–L15**, **L25** e **L26**, conformação C4-exo para um corfômero de **L01**; envelope em C3 (C3-*endo*) para os derivados **L16–L23**; e em C5 (C5-exo) para **D01** uma vez que essa foram as conformações determinadas durante a otimização estrutural. Para os experimentos de atracamento foi considerado o estado de ionização do nitrogênio dos compostos em pH fisiológico de 7,4 - sendo positivamente carregado. Os compostos **L01–L12** foram analisados frente ao experimento de atracamento com o receptor M₃-mAChR, os derivados **L13–L23** foram analisados frente a experimentos de atracamento nos receptores M₃-mAChR, AR e HR e os derivados **L24–L25** frente ao atracamento com o receptor M₁-mAChR.

4.1.2 Estrutura tridimensional dos GPCRs

Os modelos tridimensionais dos receptores muscarínico M₁ (código PDB: 5CXV) (THAL et al., 2016), M₃ mAChR (código PDB: 4DAJ) (KRUSE et al., 2012), β_2 -adrenérgico (código PDB: 2RH1) (RASMUSSEN et al., 2007) e histaminérgico H₁ (código PDB: 3RZE) (SHIMAMURA et al., 2012) foram obtidos do banco de dados de proteínas (*Protein Data Bank*) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) no site <https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>. Moléculas de água, ligantes co-cristalizados e outras cadeias co-cristalizadas foram removidas das coordenadas do arquivo PDB original antes dos experimentos de atracamento com o auxílio do programa AutoDock Tools. As estruturas dos receptores foram mantidas rígidas nos experimentos por motivos de simplificação e velocidade dos cálculos.

4.1.3 Atracamento molecular

Os experimentos de atracamento molecular foram realizados no programa DockThor, disponível *online* na plataforma do LNCC (Laboratório Nacional de Computação Científica) no endereço <https://dockthor.lncc.br/> (DE MAGALHÃES et al., 2014). As simulações consideraram a estrutura da proteína (receptor) rígida e a estrutura dos ligantes flexíveis. Alguns dos parâmetros utilizados pelo programa foram: algoritmo genérico de múltiplos mínimos (a busca é realizada em duas etapas, na primeira gera-se uma população distribuída aleatoriamente; em seguida identifica-se um grupo de menor energia e é realizada uma nova busca baseada nesse grupo que apresentou menores energias) e campo de força MMFF94S para a pontuação. Foram realizadas 30 corridas, com tamanho da população de 1000 e no máximo 1.000.000 de avaliações. A caixa de atracamento cúbica foi configurada com as dimensões de 10x10x10 Å. Esses parâmetros foram suficientes para incluir todo o sítio ativo e permitir a rotação e translação dos ligantes na região.

Os experimentos foram previamente validados empregando simulações de atracamento com ligantes conhecidos dos receptores receptores. Foram empregadas as seguintes moléculas para os experimentos de validação: (+)-muscarina, noradrenalina e difenildramina para validação do atracamento nos receptores M₃-muscarínico, β_2 -adrenérgico e H₁-histaminérgico respectivamente. No estudo dos derivados da agarose como potenciais ligantes do sítio alostérico dos receptores M₁ mAChR, os compostos **L24–L26** foram comparados com o ligante BQCA. Para este último foram consideradas como referências as delimitações do sítio alostérico, obtidas por estudos de mutagênese, realizados pelo grupo de pesquisa da *Monash University* (ABDUL-RIDHA et al., 2014a, 2014b; DAVIE et al., 2014; DAVIE; CHRISTOPOULOS; SCAMMELLS, 2013).

A inspeção visual dos complexos receptor-ligante foi realizada no programa PyMol e somente foram selecionados os arranjos nos quais o nitrogênio positivamente carregado dos ligantes estava voltado para um resíduo de Aspartato (Asp^{3.32}) posicionado na terceira hélice transmembrana dos receptores (Asp147 no receptor M₃-muscarínico; Asp113 no receptor β_2 -adrenérgico e Asp107 no receptor H₁ histaminérgico). A distância mínima entre o nitrogênio dos ligantes e o carbono carbonílico do aa Asp no sítio ativo foi delimitada para 5,5 Å para aceitação como complexo estável. Dentre os complexos receptor-ligante selecionados (somente complexos estáveis) foram amostrados aqueles que apresentaram maior variação de energia livre (ΔG^* mais negativo). A variação de energia foi utilizada como pontuação e computou somente a energia de interação de superfície de Van Der Waals e energia eletrostática por motivos de simplificação de cálculos. As energias de interação foram

verificada nos arquivos “out.log” encontrado no pacote de resultados fornecidos pelo program DockThor. O passo a passo dos experimentos de atracamento encontram-se no Anexo 1 (pág. 171).

4.2 ANÁLISE TEÓRICA DA VIABILIDADE COMO FÁRMACO (DRUGLIKENESS) E POTENCIAIS ALVOS MOLECULARES (TARGET PREDICTION)

Os cálculos de propriedade físico-químicas e farmacocinéticas para predição da biodisponibilidade de alguns compostos foram realizados com auxílio do programa *SwissADME* (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017) disponível em: <http://www.swissadme.ch/>. Para predição de potenciais alvos moleculares, foi empregado o programa *SwissTargetPrediction* (GFELLER; MICHIELIN; ZOETE, 2017) disponível em: <http://www.swisstargetprediction.ch/>. Ambas as plataformas possuem uma janela (*query*) para o desenho da estrutura química dos candidatos a fármacos.

Os dados preditivos provenientes da ferramenta *SwissADME* possuem acurácia de 92% e 88% para absorção no TGI e permeação na BHE, respectivamente, validados em um conjunto de 660 ou 260 moléculas, respectivamente, cujos resultados experimentais de alta ou baixa taxa de absorção/permeação eram conhecidos. A plataforma *SwissTargetPrediction* usa uma combinação de medidas de similaridade estrutural, tanto em 2D quanto em 3D, para comparar a molécula de interesse com uma coleção de 280.000 compostos ativos em mais de 2.000 alvos em 5 organismos diferentes.

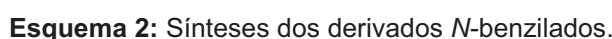
4.3 SÍNTESE

4.3.1 Pesquisa de alternativas sintéticas

Após definir as estruturas químicas a serem sintetizadas foram feitas buscas das alternativas sintéticas em bases de dados como Reaxys e SciFinder, entre outras. Alternativamente, algumas literaturas específicas foram consultadas como WHISTLER, WOLFROM (1963), para síntese de intermediários glicosídicos, GREENE, WUTS (1999) para elaborações de intermediários protegidos e LAROCK (1999) em consultas de alternativas para conversão de grupos funcionais.

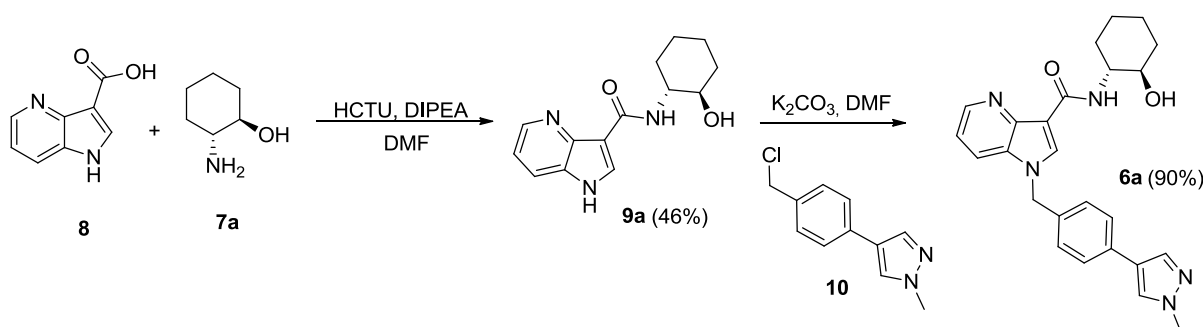
4.3.2 Procedimentos gerais para síntese das glicaminas

Os processos sintéticos foram realizados com o uso de reagentes e solventes de grau de pureza apropriados para síntese (grau reagente ou superior) das marcas Sigma-



4.3.3 Procedimentos gerais para síntese de derivados arilpirrólicos

Os derivados arilpirrólicos foram obtidos através de reações de *N*-acilação e *N*-alquilação como demonstrado no exemplo do Esquema 3 para síntese do derivado **6a**. A síntese foi realizada em duas etapas. Na primeira, a ligação C-N foi formada pelo ataque nucleofílico do nitrogênio da amina primária **7a** no carbono carbonílico do ácido carboxílico de **8**. Essa reação foi auxiliada pelo reagente de acoplamento HCTU (hexafluorofosfato de O-(6-clorobenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurônio). Na sequência, a molécula final (representado no esquema por **6a**) foi obtida através da reação de substituição nucleofílica bimolecular (no caso, *N*-alquilação) entre **9a** e o haleto de alquila **10**. Essa mesma estratégia de síntese foi utilizada para a obtenção de outros 57 derivados arilpirrólicos, os quais estão demonstrados no Anexo 4 (pág. 190). A descrição detalhada das sínteses e estruturas químicas e a discussão dos resultados das reações e procedimentos de purificação foram reportados na forma de artigo, o qual encontra-se na seção de Resultados (Parte II) no item 6 (a partir da pág. 107).



Esquema 3: Exemplo de síntese de um derivado arilpirrólico (**6a**)

4.3.4 Otimização da síntese e cálculos de rendimentos

Para otimizar algumas das etapas sintéticas foram realizados os experimentos de síntese com alteração de condições da reação como tempo e temperatura, concentração de catalisador e reagentes e processos de purificação. Após purificação conveniente, foram efetuados cálculos dos rendimentos, os quais permitiram avaliar a melhor condição reacional.

Os resultados dos rendimentos foram calculados em termos de porcentagem com base no rendimento molar dos compostos utilizando para os cálculos os dados obtidos por gravimetria dos produtos purificados.

4.4 PURIFICAÇÃO

Em cada uma das reações realizadas foram aplicadas metodologias de purificação adequadas para cada caso. No item 5.5 (pág 81) foram detalhados todos os procedimentos de purificação para cada composto. A seguir são citadas brevemente as metodologias de purificação empregadas.

4.4.1 Extração

O processo de extração com solventes foi empregado para isolar substâncias dissolvidas, misturas sólidas ou ainda para remoção de impurezas solúveis indesejáveis na mistura. Essa técnica baseia-se na afinidade entre substâncias e líquidos extratores com polaridades semelhantes frente à presença de subprodutos ou contaminantes de polaridade diferente da substância de interesse.

4.4.2 Filtração

Para separar os produtos de hidrólise solúveis dos polissacarídeos não hidrolizados utilizou-se filtração com funil de Buchner com placa porosa sinterizada número 2.

4.4.3 Cristalização

Cristalização foi um método utilizado para purificar compostos sólidos que se encontravam dissolvidos em meio juntamente com substâncias indesejadas. Através dessa técnica pôde-se separar compostos que são solúveis a quente e insolúveis a frio num dado solvente. Possibilita ainda a obtenção do sólido quando na adição de um segundo solvente torna o composto de interesse menos solúvel na mistura de líquidos gerada.

4.4.4 Cromatografia em sílica

A cromatografia em coluna foi realizada utilizando-se sílica gel 60 (220-240 mesh) e misturas de solventes variadas medidas na base v/v como fase móvel. A quantidade de sílica e as dimensões da coluna foram selecionadas de acordo com a relação descrita por STILL; KAHN; MITRA, 1978.

Para o controle das reações de síntese e monitoramento das frações geradas na cromatografia em coluna utilizou-se a cromatografia em camada delgada (CCD). Foram

utilizadas cromatoplasacas de alumínio revestidas com sílica gel 60 (Merck). Essas placas foram eluídas com diferentes misturas de solventes. A detecção dos compostos foi realizada com auxílio de um revelador, sendo solução 2% resorcinol em $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{EtOH}$ (1:20) ou solução 5% ninhidrina em EtOH.

4.4.5 Cromatografia de troca iônica

Para cromatografia de troca iônica empregou-se resina de troca aniônica Amberlite IRA 410 e gel de troca catiônica CM Sepharose CL-6B (Sigma), ativadas e eluídas de acordo com instruções dos fabricantes.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE SÍNTESE

4.5.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos com os espectrômetros BRUKER Avance DRX 400 ou BRUKER Avance 600 operando na frequência base de 400,1 MHz ou 600,1 MHz para os núcleos de ^1H e 100,63 MHz ou 150,903 MHz para os núcleos de ^{13}C respectivamente. Experimentos bidimensionais, ^1H - ^{13}C HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) e ^1H - ^{13}C HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) também foram realizados quando necessários.

A atribuição de sinais e as magnitudes das constantes de acoplamento foram obtidos a partir dos espectros de RMN de ^1H . A aparência dos sinais foi indicada pelas abreviaturas b, s, d, t, q, e m para “*broad*” ou largo, singlete, duplete, tripleto, quarteto e multiplete respectivamente; e ainda, dd para duplo duplete e dt para duplo tripleto.

As amostras foram solubilizadas nos solventes deuterados e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro para análise a temperaturas de 30°C. Os deslocamentos químicos expressos em ppm foram determinados utilizando como padrão interno o TMS ou acetona. Os espectros foram analisados com auxílio do programa TOPSPIN 2.1.

4.5.2 Espectrometria de massas

Os experimentos de ESI-MS (ionização por eletrodispersão acoplada à espectrometria de massa) foram realizados no espectrômetro MICROMASS QUATTRO LC-MS/MS de triplo quadrupolo. Para realização das análises as amostras foram diluídas (de 100 $\mu\text{g/mL}$ a 10 $\mu\text{g/mL}$) em misturas constituídas de metanol, clorofórmio e água e

introduzidas no espectrômetro por injeção direta. O gás de nebulização e desolvatação empregado foi N₂. A temperatura da fonte, bem como as voltagens do capilar e cone foram ajustadas para fornecer a melhor visualização dos íons pseudomoleculares para cada caso específico.

4.5.3 Determinação do poder rotatório específico

O poder rotatório dos compostos foi obtido a partir de soluções com concentração de 1,0% (p/v) dos compostos em água destilada. Utilizou-se para as medições um polarímetro modelo Jasco P-200 o qual possuía como fonte de emissão uma lâmpada de sódio operando no comprimento de onda de 589 nm à temperatura de 25 °C. A cubeta possuía 100 mm de comprimento definindo o caminho óptico. Os cálculos foram processados e operados no programa Spectra Manager seguindo-se a seguinte equação:

$$[\alpha]_D^{25^\circ\text{C}} = \frac{100 \cdot \alpha}{l \cdot c}$$

Onde:

α = ângulo medido no polarímetro

l = comprimento da cubeta em dm

c = concentração da amostra em g/100mL

4.6 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

4.6.1 Acúmulo de mio-inositol fosfato (IP₁)

A capacidade dos compostos teste de ativar ou modular os receptores do subtipo M₁ foi verificada através da quantificação de IP₁ acumulado em células de ovário de hamster (células CHO) tranfectadas com o receptor humano M₁ e que expressam uma quantidade estável e conhecida de receptores na superfície celular. O IP₁ é um metabólito da cascata de ativação de GPCRs que apresentam a subunidade α_q , como é o caso do receptor M₁. A quantificação é feita empregando-se kit comercial 62IPAPEC (Cisbio) com anticorpos anti-IP₁ marcados e a leitura é realizada por fluorescência. A quantidade de IP₁ acumulada reflete proporcionalmente a potência dos compostos testados, sendo resultante da afinidade dos compostos (pK_B), cooperatividade com a ACh ($\alpha\beta$) e atividade intrínseca (τ_B). Os resultados são expressos em percentual máximo de estímulo (%Emáx), o qual atinge 100% com uma concentração de cerca de 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de ACh. Os PAMs foram testados na

concentração única de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ juntamente com concentrações crescentes de ACh. Assim foi possível obter curvas de concentração-resposta, de onde foi possível extrair os dados de %Em_{áx} basal (na ausência de ACh) e EC₅₀ (concentração para atingir 50% do estímulo máximo). Esses dados correlacionan-se com a atividade intrínseca e a atividade modulatória dos PAMs, respectivamente. Esse ensaio foi realizado para 41 compostos da série de arilpirróis sintetizados no presente trabalho e serviu como resultado preliminar do perfil da atividade alostérico dos compostos. O detalhamento experimental, metodologias de cálculo e os resultado e discussão foram apresentados na forma de artigo o qual encontra-se no item 6 (pág. 107).

4.6.2 Competição com radioligante

Os ensaios de competição com o antagonista *N*-metilescopolamina tritilado ($[^3\text{H}]\text{NMS}$) foram realizados para cinco compostos selecionados da série de arilpirróis e outros três compostos de referência, para comparação. Esses ensaios foram utilizados para estimar a afinidade (pK_B) dos compostos pelos receptores M_1 e também para o cálculo da cooperatividade de ligação da ACh (α). Esses experimentos foram executados pela Dra. Elham Khajehali do Departamento de Farmacologia da *Monash University*. O detalhamento experimental, metodologias de cálculo e os resultado e discussão foram apresentados na forma de artigo o qual encontra-se no item 6 (pág. 107).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO - PARTE I: GLICAMINAS

5.1 ANÁLISE COMPUTACIONAL

5.1.1 Estereoquímica e conformação dos derivados **L01** e **D01**

No presente trabalho, os resultados dos diversos complexos receptor-ligante foram avaliados visualmente, em uma primeira etapa. A interação eletrostática entre o nitrogênio (carregado positivamente) nos ligantes e o grupo carboxílico (carregado negativamente) do aminoácido aspartado localizado no sítio ativo dos GPCRs foi determinante para seleção (ou exclusão) de arranjos prováveis. A partir daí, foi analisado o somatório de energias liberadas (ΔG^*) quando na formação do complexo, considerando, no caso, somente as interações de superfície e eletrostáticas. Se por um lado a análise da ΔG^* pode ser incompleta, uma vez que não são consideradas as energias de dessolvatação, entropia e entalpia do sistema, por outro, essa análise reflete se, ao menos, houve fatores favoráveis à formação e estabilização do complexo. Isoladamente, os valores de ΔG^* não têm significado prático, porém, a comparação entre esses valores para diferentes complexos, diferentes derivados, e ainda a comparação com os valores de ΔG^* de ligantes conhecidos (usados para validação e como referência), pode ser válida para predição de complexos mais estáveis. No presente trabalho os valores de ΔG^* não foram utilizados para escolha do melhor complexo receptor-ligante. Isso foi realizado observando-se o posicionamento do ligante em relação aos aminoácidos do sítio ativo. Por outro lado, esses valores foram empregados para comparação dos diferentes arranjos receptor-ligante selecionados bem como com os arranjos receptor-ligante das moléculas de referência. Assim, foram utilizados como parâmetro da predição de interação ou formação de complexos mais estáveis.

Tendo como modelo e atentando-se para as similaridades estruturais entre as moléculas da (+)-muscarina e o anel substituído tetra-hidrofurano correspondente à unidade de 3,6-anidrogactose (3,6-AnGal), iniciou-se a investigação da possibilidade de interação entre as glicaminas semissintéticas (derivados do referido anidroaçúcar) e o receptor muscarínico. Duas galactanas distintas foram selecionadas para o estudo inicial da influência da estereoquímica na ligação e complementariedade com os receptores muscarínicos M_3 , sendo elas os polissacarídeos agarose e *kappa*-carragenana. Estes biopolímeros são extraídos de algas marinhas vermelhas da Classe *Rhodophyta*, são importantes representantes de agaranas e carragenanas, respectivamente e também apresentam-se disponíveis comercialmente. Sua classificação está relacionada à estereoquímica da unidade 4-ligada, representada nestes polímeros pela unidade 3,6-AnGal, sendo que para as agaranas esta unidade apresenta-se como o enantiômero-L e

para as carragenanas como enantiômero-D. Na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**0 ág. 35 são mostradas as unidade mínimas repetitivas para agarose ($[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-galactopiranosse-(1}\rightarrow 4)\text{-3,6-anidro-}\alpha\text{-L-galactopiranosse-(1}\rightarrow]_n$) e *kappa*-carragenana ($[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-galactopiranosse-4-sulfato-(1}\rightarrow 4)\text{-3,6-anidro-}\alpha\text{-D-galactopiranosse-1}\rightarrow]_n$).

O receptor muscarínico do subtipo M_3 mAChR foi o escolhido para os estudos preliminares por se tratar de um alvo molecular lógico, especialmente considerando-se a semelhança estrutural entre os protótipos (compostos propostos neste trabalho) e a (+)-muscarina (agonista muscarínico não subtipo-específico). A estrutura tridimensional desse receptor foi a primeira a ser descrita dentre os diferentes subtipos de receptores muscarínicos. Além disso, agonistas e antagonistas M_3 -muscarínicos apresentam grande potencial terapêutico. Ambos os subtipos M_1 e M_3 são extremamente similares na sequência de aa e na estrutura tridimensional do sítio ortostérico e são ditos subtipos estimulatórios, os quais interagem com a proteína G do subtipo $G\alpha_q$ (estimula fosfolipase C, gerando aumento dos níveis intracelulares de IP_3 e DAG).

Os compostos **L01** e **D01** são diastereoisômeros e são os representantes mais simples de derivados do anel tetra-hidrofurano provenientes da estrutura nativa da unidade de 3,6-AnGal, que podem ser obtidos a partir dos polissacarídeos selecionados para este trabalho. Estes compostos foram submetidos à análise computacional em experimentos de atracamento frente ao receptor muscarínico M_3 . Os resultados foram comparados com o ligante conhecido para este receptor, (+)-muscarina, e selecionados de forma a observar a melhor sobreposição de complexos e menores energias de interação.

O sítio de ligação ortostérico do receptor M_3 mAChR e a posição com que ligantes interagem no mesmo já são conhecidos, o que facilitou o trabalho de identificação de complexos estáveis. Este sítio é definido pelos aminoácidos Asp 147^{3,32}, Tyr 148, Tyr 506, Tyr 529, Asn 507^{6,52}, Thr 231 e Trp 199 (Figura 12). Neste caso, o aminoácido aspartato na trigésima segunda posição na alça TM3 é responsável por interações eletrostáticas com o nitrogênio quaternário dos ligantes e a asparagina na quinquagésima segunda posição na alça TM6 é responsável por ligações de hidrogênio com ligantes. Os três resíduos de tirosina (Tyr 148, Tyr 506 e Tyr 529) são responsáveis por interações hidrofóbicas, de Van der Waals ou de elétrons π (KRUSE et al., 2012). A Figura 12 representa a interação de **L01** no sítio ortostérico do receptor e sua sobreposição com a molécula de referência.

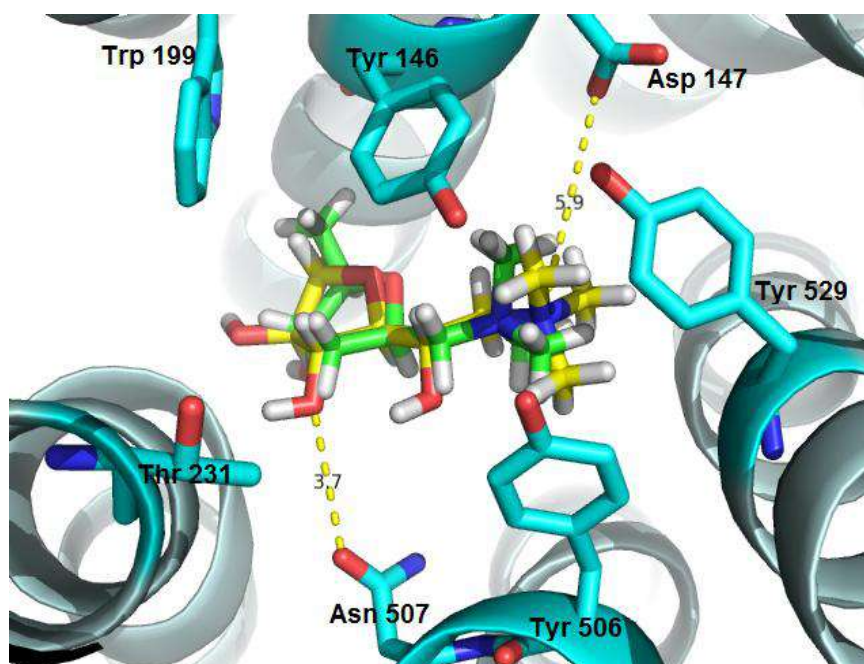


Figura 12: Sobreposição de **L01** (em amarelo) e (+)-muscarina (em verde) na interação com o M₃ AChR. Os aminoácidos destacados delimitam o sítio ortostérico do receptor.

A primeira análise de atracamento molecular envolveu os derivados **L01** e **D01**, como citado anteriormente. Os resultados dos experimentos computacionais revelaram uma vantagem para o derivado do enântiômero-L, ou seja, **L01**. Ambos os ligantes resultaram em complexos de atracamento corretos no sítio ortostérico do receptor (validados pelo atracamento com a (+)-muscarina), porém **L01** apresentou maior variação de energia, o que possibilitou a predição de que a interação receptor-ligante seria mais estável para esta molécula em comparação com o diastereoisômero-D. Além dos valores mais negativos de ΔG^* , as distâncias em relação aos aminoácidos do sítio ativo foram menores, sugerindo um melhor encaixe do derivado em questão. Surpreendentemente, o derivado **L01** apresentou ΔG^* menor do que a muscarina, revelando-se um ligante muito promissor (Tabela 1). Ambos os parâmetros, ΔG^* e posicionamento (distâncias) foram levados em consideração para escolha do melhor complexo receptor-legante.

Tabela 1: Comparação de parâmetros resultantes da formação dos complexos receptor-ligante nos experimentos de atracamento molecular com receptor M₃-mAChR

| Ligantes | ΔG^* (kcal/mol) | Distância (Å) | |
|---------------|----------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| | | $\underline{N}^+ - \text{Asp 147}$ | $\underline{HO} - \text{Asn 507}$ |
| (+)-Muscarina | -16,0 | 6,2 | 5,0 |
| L01* | -20,0 | 5,9 | 3,7 |
| D01 | -13,4 | 6,3 | 4,5 |

*L01 na conformação C4-*endo*; ΔG^* : energia liberada (interações de superfície e eletrostática);

O composto **L01** apresenta um carbono hidroxilado (C2) a mais em sua cadeia lateral (Figura 13), fazendo com que este composto seja mais volumoso em comparação com a molécula da muscarina. Esta característica possivelmente contribuiu para um preenchimento mais adequado da cavidade do sítio ortostérico. Além disso, a molécula em questão apresenta um grupo hidroxila adicional ligado ao anel furanosídeo em C4 e C5, em comparação com a muscarina que apresenta somente um grupo hidroxila ligado ao anel em C4. Este grupo hidroxila pode estar envolvido na formação de ligações de hidrogênio adicionais com os resíduos de aminoácidos do sítio ortostérico do receptor (especificamente com Asn 507), contribuindo para o aumento nas forças de interação e redução da energia livre de ligação. As características citadas anteriormente também são encontradas na molécula **D01**, porém a diferença nos valores de energias de interação pode ser compreendido quando se considera a estereoquímica dos grupos hidroxila em C4 e C5. Estas afirmações foram corroboradas pela avaliação das distâncias entre os grupos hidroxila em C4 e o aminoácido Asn 507 (Tabela 1, Figura 12). Para o ligante **L01** estes valores são menores, sugerindo que a interação desta estrutura com o receptor é mais forte.

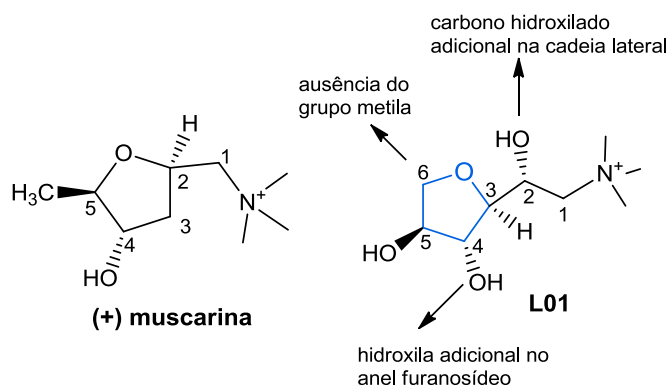


Figura 13: Comparação esquemática das diferenças entre **L01** e a molécula de referência (+)-muscarina.

Para avaliar detalhadamente a importância da estereoquímica na interação de **L01** com o receptor, avaliou-se ainda a relevância da conformação do anel tetra-hidrofurano substituído para interação receptor-ligante. Nesta análise, comparou-se dois diferentes confôrmeros de **L01**, definidos como um envelope em C4 (Figura 14). Este envelope pode ser definido de duas maneiras: voltado para o mesmo lado da cadeia lateral (C4-*endo*) ou voltado para o lado oposto a cadeia lateral (C4-*exo*). Nesta avaliação foi possível verificar que o confôrmero C4-*exo* não foi capaz de gerar um complexo receptor-ligante coerente no sítio ativo. O arranjo espacial deste confôrmero não apresentou os grupos importantes para interação nas posições adequadas, ocupando um espaço consideravelmente menor (o que pode ser reconhecido quando se observa a distância entre $^+N-OH_5$ de 5,2 Å). A

Tabela 2 resume as distâncias e energias liberadas na formação dos complexos receptor-ligantes testados para os confôrmeros de L01. A ΔG^* reportada para o **L01** C4-*exo* refere-se à interação com aminoácidos em um local topograficamente distinto do sítio ortostérico.

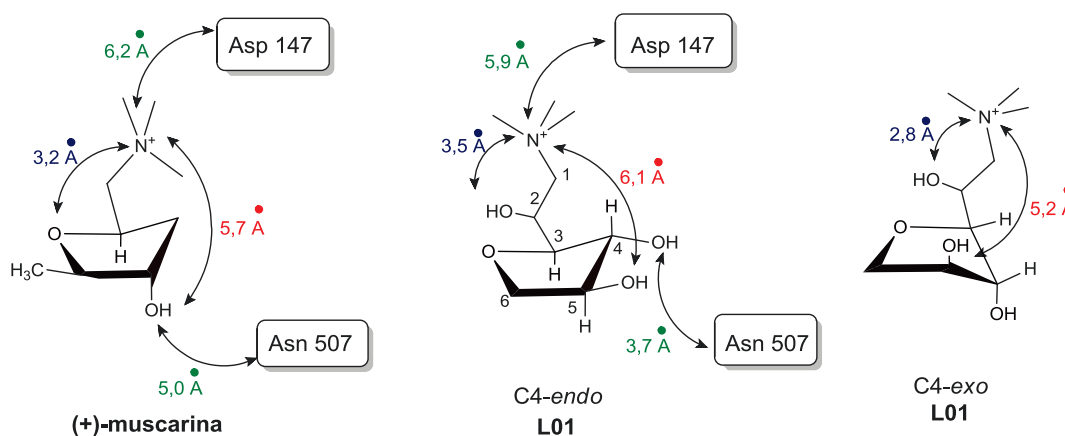


Figura 14: Distâncias entre grupos farmacofóricos e distâncias dos grupos farmacofóricos em relação aos aminoácidos do sítio ativo

Tabela 2: Comparação de parâmetros resultantes da formação dos complexos receptor-ligante dos confôrmeros de L01 nos experimentos de atracamento molecular com receptor M₃-mAChR

| Ligantes | ΔG^* (kcal/mol) | Distância (Å) | |
|----------------------|----------------------------|------------------|-----------------|
| | | $N^+ - Asp\ 147$ | $HO - Asn\ 507$ |
| (+)-muscarina | -16,1 | 6,2 | 5,0 |
| L01-C4- <i>endo</i> | -20,0 | 5,9 | 3,7 |
| L01-C4- <i>exo</i> * | -14,2** | 10,7 | 10,0 |

*o confôrmero C4-*exo* não apresentou complexo de interação coerente com o sítio ortostérico. **a energia liberada reportada refere-se à interação com aminoácidos em sítio topograficamente distinto ao sítio ortostérico. ΔG^* : energia liberada (interações de superfície e eletrostática);

O derivado **L01** na sua conformação C4-*endo* apresentou grupos hidroxila vicinais na posição equatorial do anel, e é consistente com a conformação energeticamente mais estável para esta molécula. Portanto, a conformação C4-*endo* seria a aquela encontrada em solução em pH fisiológico. Tendo em vista os resultados mais promissores para o composto **L01** C4-*endo*, enantiômero-L do anel tetra-hidrofurano, proveniente da estrutura da unidade de 3,6-AnGal da agarose, prosseguiu-se as análises computacionais com derivados que possuem esta mesma estereoquímica.

5.1.2 Experimento de atracamento molecular

Os derivados elaborados neste trabalho apresentam potencial para interação com receptores muscarínicos, haja vista sua similaridade estrutural com a (+)-muscarina. A fim de identificar compostos mais promissores, baseando-se na estrutura de **L01**, foram

realizados estudos de atracamento ligante- M_3 -mAChR com as substâncias hipotéticas representadas na Figura 15.

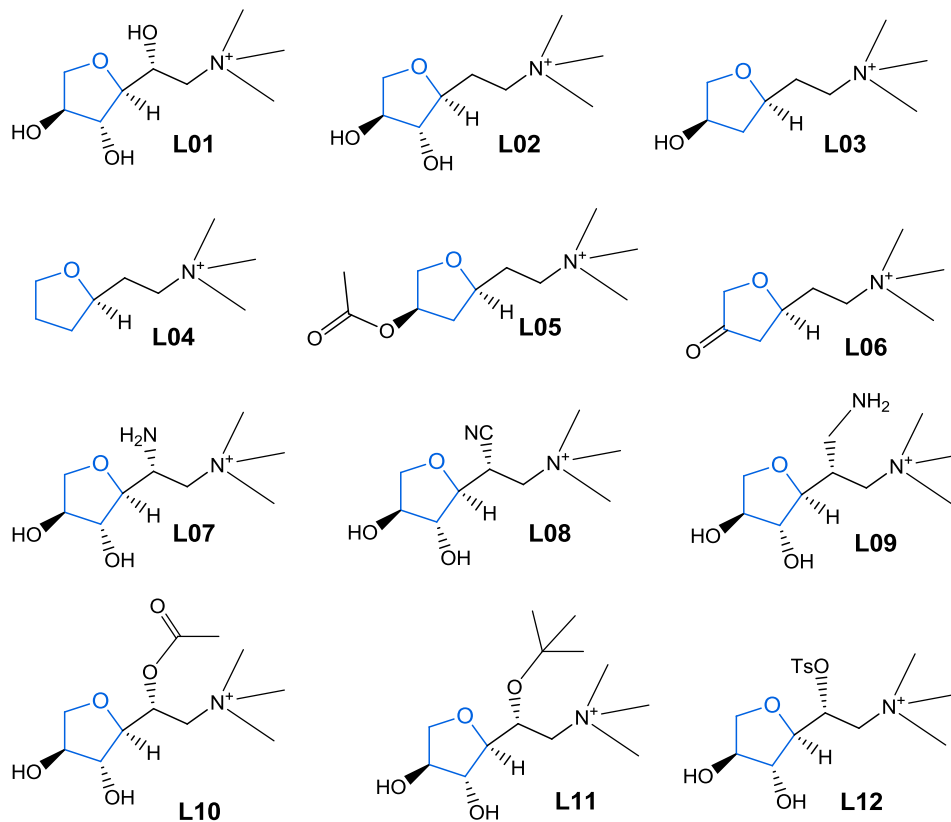


Figura 15: Moléculas hipotéticas submetidas ao ensaio de atracamento nos M_3 -mAChR, tendo como protótipo o derivado **L01**.

O composto **L01** apresentou características peculiares quanto à interação com o receptor muscarínico M_3 nos testes preliminares para a avaliação de sua estereoquímica e conformação. Este composto, com duas hidroxilas ligadas diretamente ao anel tetra-hidrofurano, pode ser enquadrado como um derivado 3-hidroxi-muscarínico. Sugere-se que ambos os grupos hidroxila (em C4 e C5) contribuiriam para a interação com o resíduo da aminoácido Asn507, presente no sítio ortostérico, o que reforçaria as interações e tornaria a formação do complexo receptor-ligante mais favorável. Para avaliar a dimensão da importância dessas interações foram propostos alguns ligantes. Nestes compostos, variou-se o número de grupos hidroxila da molécula (**L01-L04**), propôs-se a inserção de um grupo para bloquear C5 (**L05**) e ainda sugeriu-se a mudança do grupo hidroxila para carbonila (**L06**) (Figura 15). Os resultados obtidos nesta fase dos testes computacionais de atracamento confirmaram a importância de ambos os grupos hidroxila do anel tetra-hidrofurano para a interação com o receptor. O composto **L01** apresentou a menor ΔG^* em comparação com todos os demais ligantes estudados nos complexos selecionados (Tabela 3).

Tabela 3: Comparação da energia liberada na formação de complexos receptor-ligante para os protótipos L01-L12 nos experimentos de atracamento molecular com receptor M₃-mAChR

| Ligantes* | ΔG^* (kcal/mol) | Distância (Å) | |
|---------------|----------------------------|--------------------------|--------------|
| | | N ⁺ – Asp 147 | HQ – Asn 507 |
| (+)-muscarina | -16,1 | 6,2 | 5,0 |
| L01 | -20,0 | 5,9 | 3,7 |
| L02 | -14,2 | 6,0 | 3,9 |
| L03 | -13,5 | 6,1 | 3,9 |
| L04 | -9,0 | 6,0 | - |
| L05 | ** | - | - |
| L06 | -10,4 | 6,1 | 4,6 |
| L07 | -18,7 | 5,9 | 3,7 |
| L08 | -15,3 | 6,0 | 3,9 |
| L09 | -14,6 | 6,1 | 4,0 |
| L10 | ** | - | - |
| L11 | ** | - | - |
| L12 | ** | - | - |

* todos os ligantes foram minimizados, obtendo-se o conformero *C4-endo* como estruturas de menor energia. ** não houve atracamento em posicionamento correto para interação com o sítio ortostérico. ΔG^* : energia liberada (interações de superfície e eletrostática).

Durante esta avaliação pôde-se observar que o ligante **L05**, o qual apresenta um grupo hidroxila em C5 acetilado, apresentou um tamanho incompatível com o tamanho da cavidade onde se encontra o sítio ortostérico e, assim, não foi capaz de interagir com o receptor formando complexos coerentes. Nesta análise ficou demonstrado também o aumento nos valores das energias de interação de **L04** (ausência de grupos hidroxila em C4 e C5) e **L06** (grupo carbonila em C5) devido à ausência de grupos hidroxila, doadores e aceptores de ligações de hidrogênio na interação com o receptor. Sendo assim, não foram propostas outras modificações para a posição C5 do anel tetra-hidrofurano.

Ao mesmo tempo, durante a inspeção visual dos complexos de interação, identificou-se que haveria um espaço no sítio ortostérico para modificações em C2. Foram propostos então os compostos **L07–L12**. A avaliação dos resultados de atracamento molecular revelou que substituintes pequenos e hidrofílicos permitem o correto posicionamento no sítio ortostérico do receptor, já outros grupos maiores, prejudicam as interações receptor-ligante. O composto **L07** apresentou ΔG^* favorável a formação do complexo receptor-ligante semelhante a observada para **L01**, porém apresenta rota sintética muito mais elaborada e trabalhosa. Por esse motivos sua síntese não foi explorada nessa oportunidade. Como nenhuma das modificações químicas propostas foi capaz de gerar compostos com características que melhorassem a interação com o receptor, prosseguiram-se os estudos tendo como protótipo o derivado **L01**.

5.1.3 Ligação com diferentes GPCRs

Para demonstrar o potencial do uso da agarose como material de partida para elaboração de derivados capazes de interagir com diferentes tipos de GPCRs, iniciaram-se experimentos de atracamento com a avaliação de 12 compostos (**L01**, **L13–L23**, Figura 16) em três receptores diferentes: M_3 -mAChR, β_2 -adrenérgico (AR) e H_1 -histaminérgico (HR). Todos estes receptores pertencem à Classe A de GPCRs e todos são capazes de ligar-se a aminas, sendo alvos moleculares para o desenvolvimento de inúmeros fármacos. A biblioteca hipotética incluiu compostos com três esqueletos carbônicos diferentes (colunas na Figura 16) inspirados em ligantes conhecidos para estes receptores (discutido a seguir). Esses foram combinados com diferentes graus de alquilação do nitrogênio (linhas na Figura 16). O intuito dessa avaliação foi demonstrar que, através de modificações químicas simples, seria possível alcançar moléculas com diferentes especificidades empregando-se um único material de partida, no caso, a agarose.

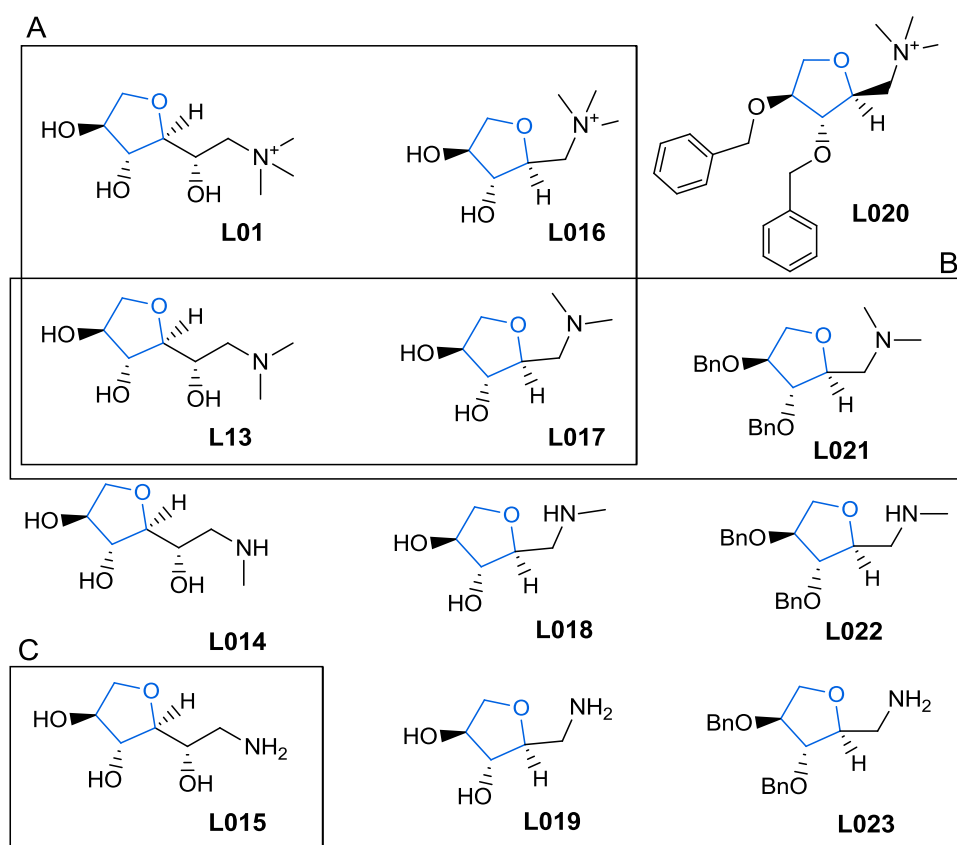


Figura 16: Moléculas hipotéticas para ligação em diferentes GPCRs. O retângulo A delimita os compostos que interagiram apropriadamente com o M_3 -mAChR; B, aqueles que interagiram com o HR; e C, aqueles que interagiram com o AR.

Os ligantes **L02–L12** não foram avaliados nessa etapa, uma vez que para a obtenção dos mesmos seriam necessárias rotas de síntese complexas, com várias etapas de proteção de grupos funcionais, reações regio- e estereosseletivas, possivelmente

reações envolvendo catálise enzimática, entre outros. Sugere-se, no entanto, que tais derivados hipotéticos possam ser objeto de estudo em outros projetos.

Para avaliação dos complexos de atracamento considerou-se os aminoácidos do sítio ortostérico do receptor M_3 mAChR: Asp 147^{3.32}, Tyr 148, Tyr 506, Tyr 529, Asn 507^{6.52}, Thr 231 e Trp 199 (KRUSE et al., 2012); do receptor β_2 -adrenérgico: Asp 113^{3.32}, Phe 290, Ser 267, Ser 204 (BRUECKNER et al., 2013); e receptor H_1 histaminérgico: Asp 107^{3.32}, Phe 434 (SHIMAMURA et al., 2012). Além disso, considerou-se coerentes aqueles complexos receptor-ligante nos quais o nitrogênio dos pequenos ligantes interagiu (proximidade menor de 5.5 Å) com o aminoácido aspartato posicionado na 32ª posição da terceira α -hélice dos receptores.

Foram identificadas seis moléculas capazes de formar complexos estáveis coerentes com os receptores (Tabela 4 e Figura 16). Os compostos **L01**, **L13**, **L16** e **L17** atracaram no receptor M_3 -mAChR com energias de interação favoráveis (mais negativas). Os derivados **L13**, **L17** e **L21** formaram complexos com o receptor H_1 histaminérgico, porém somente o composto **L21** apresentou energias de interação menores (mais favoráveis à ligação). Já para a ligação com o receptor β_2 -adrenérgico, somente uma molécula se associou, **L15**.

Tabela 4: Resultados dos experimentos de atracamento em diferentes GPCRs

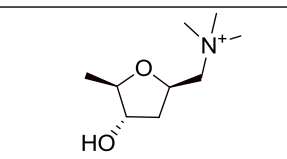
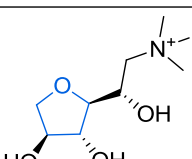
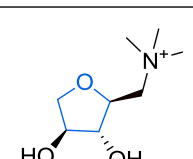
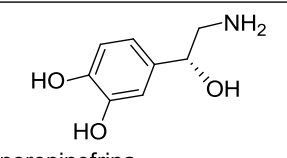
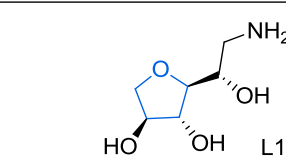
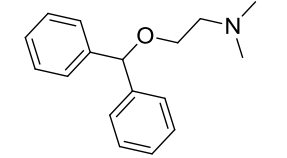
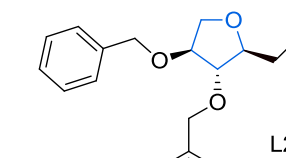
| Ligantes** | M_3 mAChR*** | β_2 -AR*** | H_1 -HR*** |
|---------------|----------------|------------------|--------------|
| (+)-muscarina | -16,1 | * | * |
| norepinefrina | * | -32,1 | * |
| difenidramina | * | * | -10,4 |
| L01 | -20,0 | * | * |
| L13 | -19,4 | * | -1,3 |
| L14 | * | * | * |
| L15 | * | -23,2 | * |
| L16 | -18,6 | * | * |
| L17 | -18,2 | * | -1,5 |
| L18 | * | * | * |
| L19 | * | * | * |
| L20 | * | * | * |
| L21 | * | * | -12,5 |
| L22 | * | * | * |
| L23 | * | * | * |

***os valores principais representam a energia liberada ΔG^* em kcal/mol; **todos os ligantes foram minimizados, obtendo-se o confôrmero C4-*endo* ou C3-*endo* como estruturas de menor energia. *não houve atracamento em posicionamento correto para interação com o sítio ortostérico.

No Quadro 2 estão demonstradas as estruturas químicas de ligantes conhecidos e das moléculas hipotéticas identificadas como promissoras nos ensaios de atracamento para comparação visual. A sobreposição de complexos formados com ligantes conhecidos e com as moléculas avaliadas está representada na Figura 17.

Após a realização de experimentos computacionais de atracamento molecular, foi possível identificar quatro compostos promissores (Quadro 2) dentre as 24 moléculas hipotéticas estudadas. Este processo virtual de seleção dos compostos com melhores características para interação receptor-ligante possibilitou economia de tempo e recursos, direcionando os esforços nas etapas de síntese. Foi possível também demonstrar a versatilidade do material de partida escolhido para este trabalho. O BE 3,6-AnGal apresentou-se como uma estrutura versátil para elaboração de diferentes entidades químicas com afinidades específicas para alguns tipos de GPCR. Apesar de alguns compostos terem apresentado características promissoras, por limitações de tempo, apenas os compostos **L01** e **D01** (para fins de comparação direta) foram eleitos para a etapa de síntese. Ainda assim, esta avaliação preliminar proporcionou subsídios teóricos para elaboração e execução de outros trabalhos na área de desenvolvimento de fármacos, como por exemplo, a síntese e avaliação de atividade anti-histamínica e anti-inflamatória do derivado **L21**.

Quadro 2: Ligantes conhecidos e protótipos promissores identificados por atracamento molecular

| Ligantes conhecidos | Protótipos Líderes |
|---|--|
|  (+)-muscarina agonista mAChR |   L01 L16 |
|  norepinefrina agonista AR |  L15 |
|  difenidramina antagonista H1-HR |  L21 |

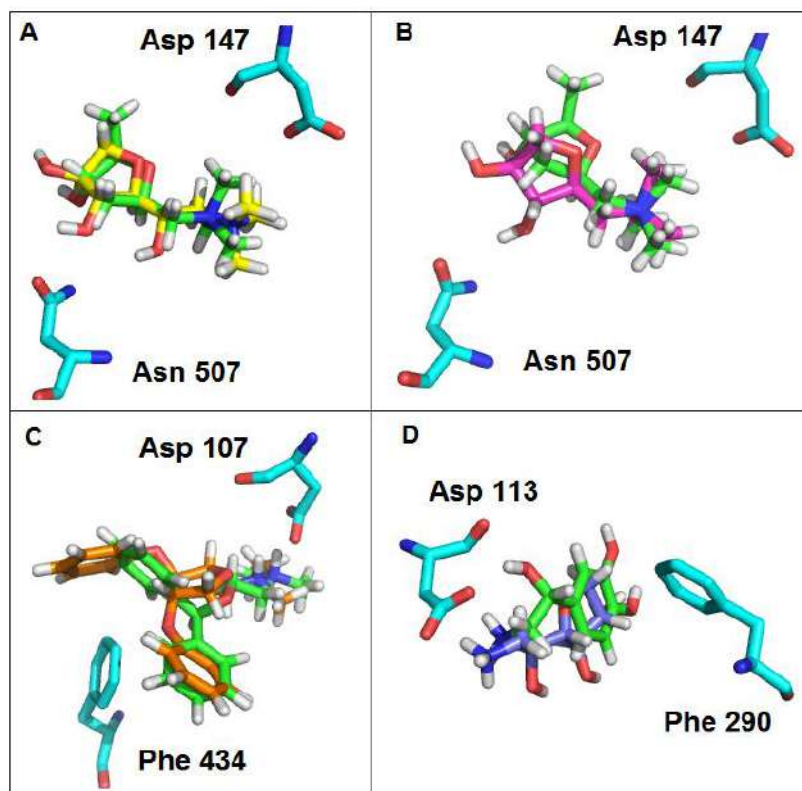


Figura 17: Sobreposição de complexos receptor-ligante de ligantes conhecidos e moléculas avaliadas, em diferentes GPCRs. **A:** muscarina (verde) e L01 sobrepostos no sítio ativo do M₃-mAChR; **B:** muscarina (verde) e L16 sobrepostos no sítio ativo do M₃-mAChR; **C:** difenidramina (verde) e L21 sobrepostos no sítio ativo do H₁-HR; **D:** norepinefrina (verde) e L15 sobrepostos no sítio ativo do β₂-AR.

5.1.4 Compostos glicídicos e o sítio alostérico dos M₁ mAChRs

As estruturas químicas dos compostos analisados por experimentos de atracamento molecular frente ao receptor muscarínico do subtipo M₁ estão representadas na Figura 18. Os resultados dos experimentos, em termos da energia liberada e posicionamento de atracamento estão demonstrados na Tabela 5 e Figura 19, respectivamente.

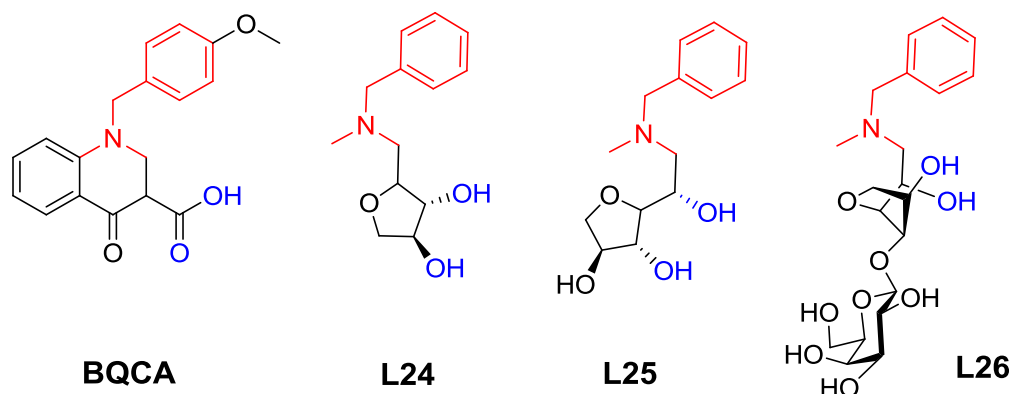


Figura 18: Estruturas químicas dos derivados glicamínicos para interação no sítio alostérico de M₁ AChR e da molécula de referência BQCA.

Tabela 5: Resultados dos experimentos de atracamento de **L24**, **L25** e **L26** no M₁ AChR.

| Ligantes* | ΔG^* (kcal/mol) | Distância (Å) | | |
|-----------|-------------------------|---------------|---------|--------|
| | | Glu-397 | Phe-182 | Tyr-85 |
| BQCA | -17,9 | 4,9 | 7,5 | 5,0 |
| L24 | -19,9 | 4,4 | 8,5 | 4,1 |
| L25 | -20,1 | 4,3 | 8,4 | 3,6 |
| L26 | -15,3 | 4,7 | 7,8 | 3,6 |

*todos os ligantes foram minimizados, obtendo-se o conformero C4-*endo* como estruturas de menor energia. ΔG^* : energia liberada (interações de superfície e eletrostática);

Todos os compostos testados virtualmente apresentaram algum grau de sobreposição com a molécula BQCA. Devido à grande diferença na natureza química dos compostos em relação à molécula de referência, a sobreposição das estruturas apresentou desvios. Apesar disso, os ligantes glicamínicos propostos apresentaram um posicionamento coerente com o espaço delimitado pelos aminoácidos do sítio alostérico e interações importantes como: (1) interação eletrostática entre o nitrogênio terciário e o resíduo Glu397; (2) interações hidrofóbicas da porção benzila com o resíduo Phe182 (posicionamento semelhante à porção benzílica na molécula de referência, BQCA); e (3) interações hidrofílicas com os resíduos de aa Tyr85 e Tyr179. Os derivados também apresentaram baixas energias de interação, o que indicaria a possibilidade de formação de um complexo receptor-ligante termodinamicamente estável. Os arranjos do atracamento

molecular podem ser vistos na Figura 19. Tendo em vista estes resultados, os ligantes **L24** e **L25** foram sugeridos como compostos promissores (valores de ΔG^* mais negativos que a molécula de referência BQCA) e foram selecionados para síntese. O composto **L26** é intermediário na síntese de **L25** por esse motivo também foi sintetizado e testado

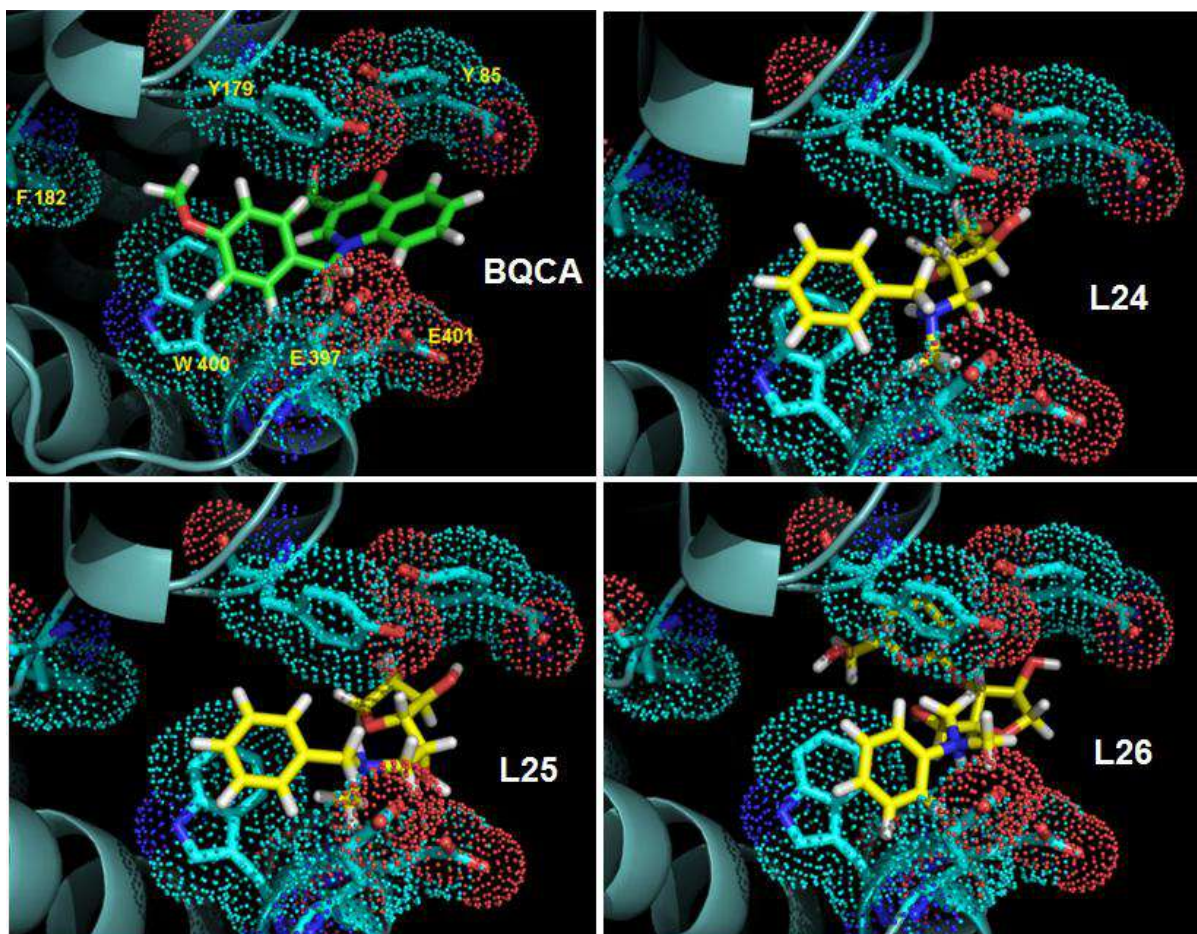


Figura 19: Atracamento dos derivados **L24**, **L25** e **L26** (em amarelo) no sítio alostérico do M_1 mAChR em comparação com o ligante de referência BQCA (em verde).

5.2 ANÁLISE TEÓRICA DA VIABILIDADE DE FÁRMACOS (DRUGLIKENESS) E POTENCIAIS ALVOS MOLECULARES (TARGET PREDICTION)

Alguns parâmetros físicoquímicos e farmacocinéticos podem ser utilizados para estimar a viabilidade (ou *druglikeness*) de fármacos. Através de ferramentas de cálculos teóricos, foi possível obter uma estimativa para os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de algumas moléculas glicamínicas. Para isso foram considerados parâmetros como massa molar, coeficiente de partição óleo/água, número de aceptores e doadores de ligações de hidrogênio e área superficial polar. Nesse estudo, foram avaliados alguns compostos glicídicos (moléculas finais e intermediários de síntese) com o auxílio da

ferramenta online *SwissADME* (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Essa plataforma fornece a compilação de resultados obtidos através de diversas metodologias de cálculo, as quais são detalhadas e referenciadas no documento original que descreve a ferramenta. Para avaliar a adequação de possíveis fármacos, aqui delineados, em relação às propriedades esperadas para que haja uma boa biodisponibilidade, foram priorizadas duas abordagens: 1) aceitação segundo modelo de Lipinski, mais conhecido como “regra dos cinco” (LIPINSKI et al., 2001); e 2) o modelo de Daina (ou Egan modificado) mais conhecido como “BOILED-egg” (*Brain Or IntestinaL EstimateD permeation method* – método da permeação do TGI ou da BHE) (DAINA; ZOETE, 2016). A Tabela 6 contém as informações sobre propriedades físico-químicas computadas para os cálculos nas abordagens priorizadas, a viabilidade (*druglikeness*) segundo modelos de Lipinski e Daina e parâmetros de biodisponibilidade e farmacocinética dos compostos selecionados para esta avaliação. A seguir, a representação gráfica da localização dos compostos no modelo BOILED-egg é demonstrada na Figura 20.

Tabela 6: Propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e de biodisponibilidade estimados pela ferramenta *SwissADME*

| Composto | L01 | L14 | L15 | L16 | L18 | L21 | L25 | L26 |
|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|
| Massa molar (g/mol) | 206,3 | 177,2 | 163,2 | 176,2 | 147,2 | 341,4 | 267,3 | 429,5 |
| HBA (N, O, OH) | 4 | 5 | 5 | 3 | 4 | 4 | 5 | 10 |
| HBD (OH) | 3 | 4 | 4 | 2 | 3 | 0 | 3 | 6 |
| TPSA (Å ²) | 69,9 | 81,9 | 95,9 | 49,7 | 61,7 | 30,9 | 73,2 | 152,3 |
| MLog P | -5,0 | -2,0 | -2,3 | -4,5 | -1,5 | 1,9 | -0,3 | -2,4 |
| WLog P | -1,83 | -2,31 | -2,57 | -1,19 | -1,67 | 2,81 | -0,55 | -2,7 |
| Sol. (mg/mL) | 211 | 1110 | 6530 | 54,8 | 286 | 0,0005 | 10,3 | 849,0 |
| <i>Druglikeness</i> Lipinski | Sim | Sim | Sim | Sim | Sim | Sim | Sim | Não |
| <i>Druglikeness</i> Daina | Sim | Sim | Sim | Sim | Sim | Sim | Sim | Não |
| Absorção no TGI ^a | Alta | Baixa | Baixa | Alta | Alta | Alta | Alta | Baixa |
| Permeação na BHE ^b | Não | Não | Não | Não | Não | Sim | Não | Não |
| Substrato gpP | Sim | Sim | Não | Não | Não | Não | Não | Não |
| Substrato cypP450 | Não | Não | Não | Não | Não | Sim | Não | Não |

HBA: *H-bond acceptors* ou aceptores de ligação de hidrogênio; HBD: *H-bond donors* ou doadores de ligação de hidrogênio; TPSA - *topological polar surface area* ou área polar da superfície; Log P – coeficiente de partição óleo/água; MLog P – indicador de lipofilicidade com cálculo baseado na topologia dos compostos; WLog P – indicador de lipofilicidade com cálculo baseado em fragmentos dos compostos; Sol. – solubilidade em água; *Druglikeness* Lipinski – Filtro de aceitação de fármacos (*druglikeness*) desenvolvido pela Pfizer considerando a “regra dos cinco” (Massa molar ≤ 500; MLog P ≤ 5; N ou O ≤ 10; NH ou OH ≤ 5); *Druglikeness* Daina – Filtro de aceitação de fármacos (*druglikeness*) de acordo com o modelo “BOILED-egg” modificado (WLog P ≤ 5,88; TPSA ≤ 131,6); TGI – trato gastrointestinal; BHE – barreira hematoencefálica; gpP – glicoproteína-P; cypP450 – citocromo-P450; ^a área branca e ^b área amarela do gráfico BOILED-egg (Figura 20 a seguir).

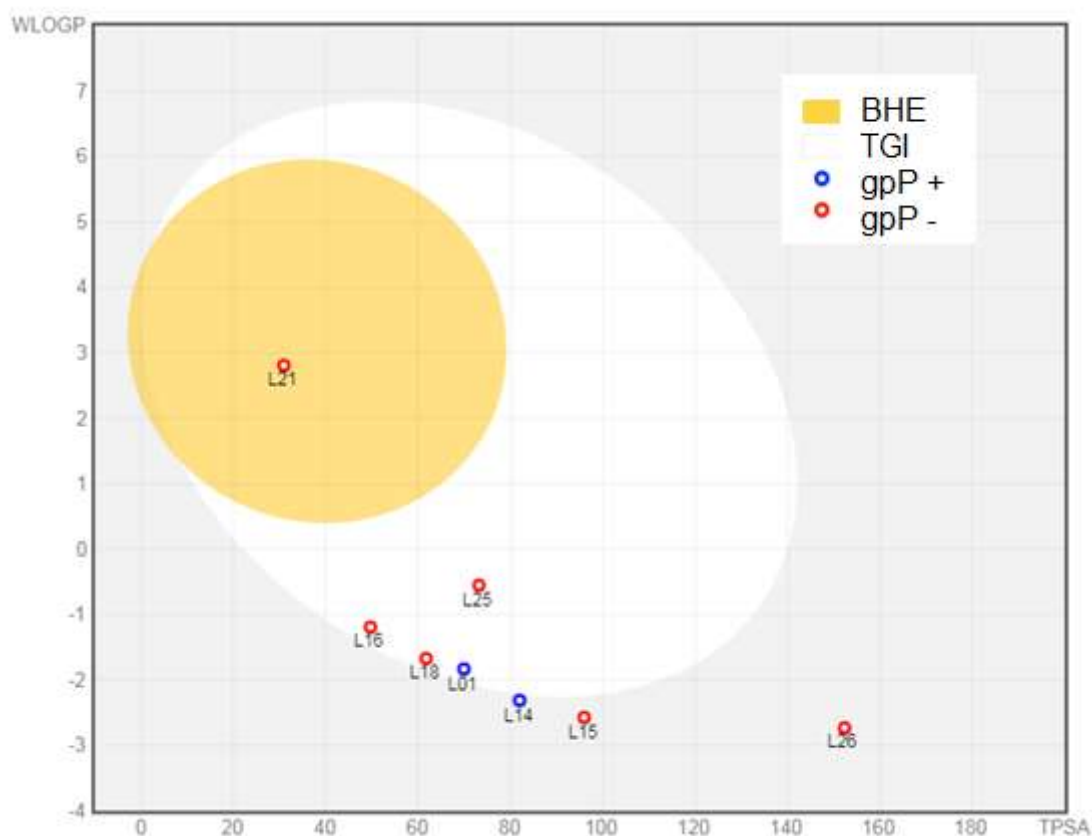


Figura 20: Representação gráfica do modelo BOILED-egg (WLog P vs. TPSA) incluindo compostos avaliados. Área branca – predição de alta absorção pelo TGI; Área amarela – predição para permeação na BHE; Pontos em azul – alerta para compostos que possam sofrer efluxo pela glicoproteína-P; Pontos em vermelho – baixa probabilidade de efluxo. Gráfico obtido com a ferramenta *SwissADME*.

Segundo a análise teórica realizada com auxílio do programa *SwissADME*, todos os compostos avaliados, exceto **L26**, foram aceitos como viáveis (*druglike*) em ambas as abordagens priorizadas (Lipinski e Daina). O composto **L26** violou dois requisitos nas abordagens de aceitação, (TPSA > 131,6 e número de grupos –OH > 5). Os compostos **L14**, **L15** e **L26** foram previstos para apresentarem baixa absorção pelo trato gastrointestinal (considerando-se difusão passiva por membrana). Conforme pode ser visto na Figura 20, os compostos **L01**, **L14**, **L15**, **L16** e **L18** estão em regiões limítrofes dos parâmetros estabelecidos para predição de alta taxa de absorção, dificultando, assim, a predição da biodisponibilidade destes compostos frente à presente análise. O composto **L21** foi o único, dentre os compostos avaliados, a apresentar propriedades físico-químicas compatíveis com a permeação da BHE. Isto, porém, não pressupõe uma vantagem uma vez que esse composto não teria um alvo específico no SNC. Na realidade, sugere-se que esse composto possa apresentar baixa seletividade para os receptores histaminérgicos, assim como é observado em muitos anti-histamínicos de primeira geração. Os derivados **L01** e **L14** foram

preditos como substrato da glicoproteína-P (gpP). A gpP, codificada pelo gene MDR1 (*multidrug resistance protein 1*), é uma bomba de efluxo, frequentemente associada à resistência aos fármacos. O composto **L21** foi previsto para ser metabolizado, sendo substrato da cypP450 (citocromo-P450). As cypP450 são enzimas que catalisam reações de oxiredução em uma variedade de moléculas, tornando-as mais polares e hidrossolúveis. Compostos positivos como substratos da gpP ou cypP450 são previstos para serem excretados mais rapidamente, sendo esse um preditor para redução da biodisponibilidade. A Figura 20 mostra o gráfico do modelo BOILED-egg onde podem ser observadas as predições de absorção gastrointestinal (TGI – área branca do gráfico) e permeação na barreira hematoencefálica (BHE – área amarela no gráfico), assim como alertas de efluxo (substratos da gpP em azul).

Além de se considerar a acurácia do método em si, vale ressaltar que as predições dizem respeito apenas ao transporte passivo (difusão por membrana) e que estruturas glicídicas (estruturas poli-hidroxiladas) com baixa massa molar têm chances de serem captadas por transportadores de carboidratos (CURA; CARRUTHERS, 2013; TANASOVA; FEDIE, 2017).

A avaliação de potenciais alvos moleculares para os compostos selecionados **L01**, **L14**, **L15**, **L16**, **L18**, **L21**, **L25** e **L26** foi realizada com auxílio do programa *SwissTargetPrediction*, disponível na web. Na Tabela 7 estão demonstrados apenas alguns dos alvos preditos na análise realizada pelo programa. As tabelas contendo todos os resultados de predição gerados pelo programa encontram-se no Anexo 2 (pág. 182).

Todos os compostos glicídicos analisados, exceto **L21**, são preditos como substrato de diversos subtipos de hidrolases, especialmente das β -galactosidases. O tratamento de infecções virais e bacterianas, câncer e diabetes estão entre os potenciais usos clínicos de inibidores de glicosil-hidrolase (GUILLARME et al., 2010). Diferentemente da análise de atracamento realizada no presente trabalho, o composto **L01** não foi predito com ligante de receptores muscarínicos e o derivado **L21** foi aceito como ligante. Por outro lado, o derivado **L16** foi predito como ligante potencial para o receptor muscarínico, concordando com a análise de atracamento realizada. O derivado **L01** foi predito também como potencial substrato da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), enzimas envolvidas na via colinérgica. Inibidores da AChE e BChE possuem diversos empregos, dentre eles o uso no tratamento da DA (MUFSON et al., 2009; POTTER, 2010). Surpreendentemente, o derivado **L21** foi predito também como ligante de receptores adrenérgicos, porém os resultados dos experimentos de atracamento realizados não corroboram essa informação. O composto **L25** foi predito como ligante de receptores dopaminérgicos. Esses GPCRs são alvos de fármacos psicotrópicos e para o tratamento da doença de Parkinson (HISAHARA; SHIMOHAMA, 2011). Curiosamente, o composto **L15** foi predito para interação com a

proteína tau associada aos microtúbulos (MAPT). Essa proteína, quando hiperfosforilada, desliga-se dos microtúbulos e forma emaranhados insolúveis, sendo esse, um dos achados em pacientes acometidos pela DA (ALLEN et al., 2014).

Tabela 7: Possíveis alvos moleculares previstos no programa *SwissTargetPrediction*

| Composto | L01 | L14 | L15 | L16 | L18 | L21 | L25 | L26 |
|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| hidrolases | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | - | ✓ | ✓ |
| receptores muscarínicos | - | - | - | ✓ | - | ✓ | - | - |
| receptores adrenérgicos | - | - | - | - | - | ✓ | - | - |
| receptores dopaminérgicos | - | - | - | - | - | - | ✓ | - |
| AChE | ✓ | - | - | - | - | - | - | - |
| BChE | ✓ | - | - | - | - | - | - | - |
| MAPT | - | - | ✓ | - | - | - | - | - |

✓ - predito como ligante (no caso de receptores) ou substrato (no caso de enzimas); AChE: acetilcolinesterase; BChE: butirilcolinesterase; MAPT: proteína tau associada aos microtúbulos

5.3 SÍNTESE

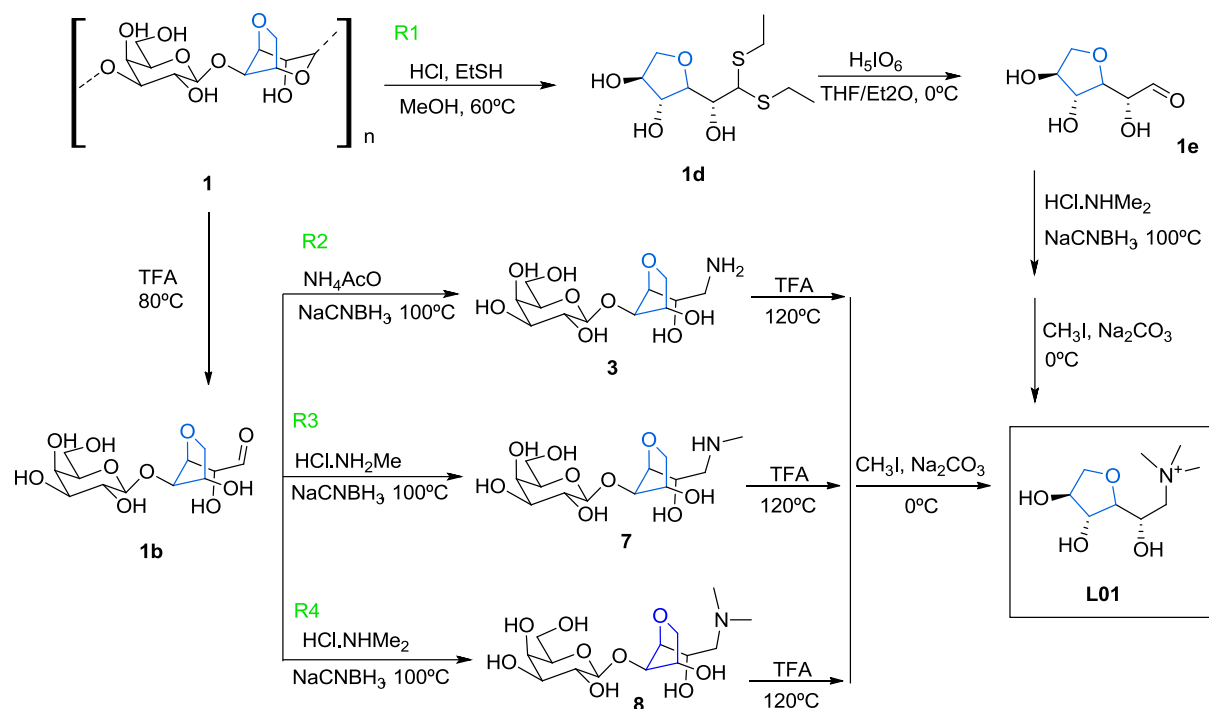
5.3.1 Otimização da síntese dos intermediários-chave (glicaminas)

Para a síntese do derivado **L01** foram propostas algumas rotas sintéticas (R1–R4), demonstradas no Esquema 4. Todas as rotas sintéticas demonstradas foram compostas por quatro etapas de síntese e, portanto, esse critério não pôde ser utilizado para decisão de qual seria a melhor rota sintética. Ainda, cada uma das rotas apresentou um inconveniente em potencial, o qual foi cuidadosamente avaliado para a escolha da rota mais viável operacionalmente.

Na rota R1 o principal complicador foi o uso do reagente etanotiol na etapa de mercaptólise total do polímero. Este reagente é volátil em temperatura ambiente e apresenta um odor pronunciadamente desagradável, o que coloca algumas restrições para a realização de reações em escalas maiores. Apesar disso, esta rota poderia ser interessante pelo fato de gerar a despolimerização completa da agarana, com a obtenção do BE 3,6-AnGal na forma de aldeído (hemiacetal) protegido. Em comparação com as demais rotas sintéticas, as purificações nas etapas iniciais desta rota foram mais fáceis. O composto 3,6-anidro-L-galactitol-dietilditioacetato **1d** foi obtido através do método adaptado por DUCATTI e colaboradores (2011). Este produto foi purificado por cristalização em éter dietílico proporcionando um rendimento de 22% (p/p) ou 25% (rendimento molar) a partir do polissacarídeo agarose **1**. A reação seguinte (desproteção do grupo aldeído) para obtenção

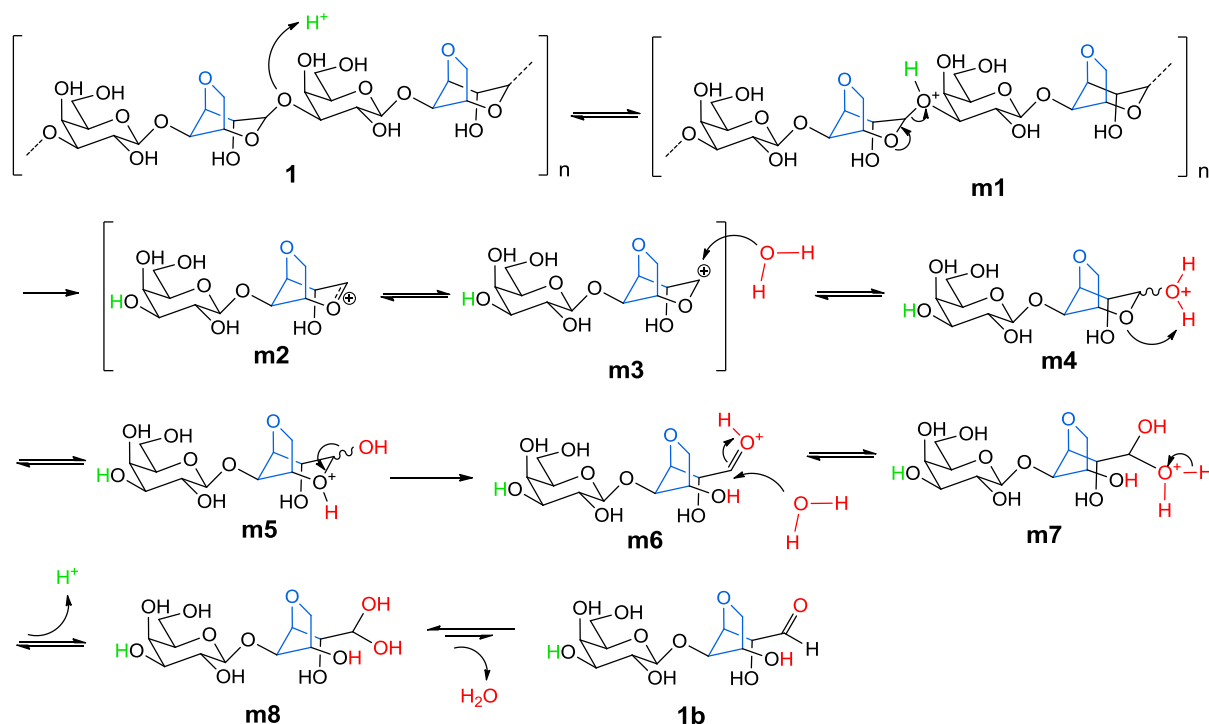
do derivado **1e** ocasionou odores muito fortes, desagradáveis e de difícil contenção. Essa rota foi descontinuada devido a esse inconveniente.

Todas as demais rotas (R2–R4) envolveram reações de hidrólise parcial da agarose **1** (para obtenção da agarobiose **1b**) seguidas da aminação reductiva de **1b** empregando diferentes sais de amônio ou aminas. O mecanismo da hidrólise da ligação glicosídica na cadeia polissacarídica de **1** é demonstrado no Esquema 5.



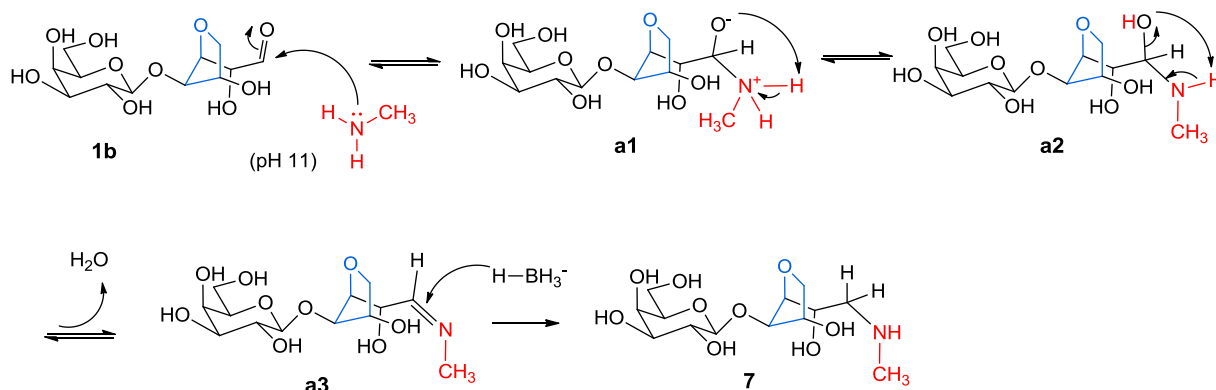
Esquema 4: Possíveis rotas sintéticas para obtenção do derivado **L01**. R1 para rota sintética 1, assim como R2, R3 e R4 para rotas 2, 3 e 4, respectivamente.

A hidrólise de O-glicosídeos catalisada por ácido em meio aquoso dá origem a um álcool e um açúcar redutor via intermediário carbocátion (estado de transição unimolecular). Assim, no caso do polissacarídeo, após protonação do oxigênio da ligação glicosídica (1→3') de **1**, em meio ácido, ocorre a formação de um intermediário protonado (**m1**) – etapa rápida. Esse por sua vez sofre decomposição – etapa lenta –, originando os intermediários cátion-glicosídicos (**m2** e **m3**) e um grupo hidroxila em C3 da unidade A. A adição de água a molécula leva à formação do terminal redutor (**m5**). Logo em seguida, ocorre a abertura da cadeia (**m6**, similar ao que ocorreria no processo de mutarrotação). O retorno para a forma cíclica da unidade B, porém, é impedido devido às torsões assumidas pelo anel 3,6-AnGal nesse processo de abertura da cadeia. A partir daí, ocorre uma adição nucleofílica, que dá origem ao hidrato (ou diol geminal) **m8**. Em meio aquoso, espera-se que haja um equilíbrio entre as formas de hidrato **m8** e aldeído livre **1b** (BOCHKOV; ZAIKOV, 1979).



Esquema 5: Proposta de mecanismo de reação de hidrólise ácida em meio aquoso da agarose **1** para obtenção da agarobiose **1b**.

Para efetivamente gerar derivados com atividade muscarínica a partir da 3,6-AnGal, é necessário que se insira um grupo amino exocíclico ao anel tetra-hidrofurano substituído. A presença do grupo aldeído nos produtos de hidrólise da agarose permite que isso seja alcançado por meio de reações de aminação redutiva realizadas na sequência. As rotas R2-R4 empregaram aminas com diferentes graus de substituição para obtenção de glicaminas. Estas rotas foram executadas com sucesso e possibilitaram a obtenção de intermediários-chave (**3**, **7** e **8**), e a transposição do anel tetra-hidrofurano, presente originalmente na unidade B do polissacarídeo (bloco que contém 3,6-AnGal), para os produtos de síntese. O mecanismo de reação da aminação de **1b** para obtenção de **7** é demonstrado no Esquema 6.



Esquema 6: Proposta de mecanismo de reação para aaminação redutiva da agarobiose **1b** para obtenção da glicamina **7** em meio aquoso básico.

A reação de aaminação consiste em duas etapas: adição e eliminação. Primeiramente ocorre a adição nucleofílica na carbonila do aldeído **1b** gerando o intermediário **a1** (ion imínio). Posteriormente ocorre o rearranjo de prótons ou transposição protônica, como pode ser visto em **a1** e **a2**. Isso leva à eliminação de uma molécula de água e formação da imina **a3**. O término da reação se dá pela redução da dupla ligação em **a3** para formação de **7** (BAXTER; REITZ, 2004; DANGERFIELD et al., 2010).

Apesar de as reações de aaminação redutiva serem amplamente exploradas em síntese orgânica, a aplicação dessa metodologia é limitada quando se trata de substratos glicídicos. Rearranjos, enolização e dimerização são alguns dos obstáculos encontrados durante a transformação de mono- e dissacarídeos em glicaminas (COSENZA; NAVARRO; STORTZ, 2011). A fim de compreender aspectos práticos da reação e obter melhores rendimentos, foi realizado um estudo de otimização das condições sintéticas, inicialmente para a obtenção do derivado 1-amino-1-desoxi-alditol **3** a partir do hidrolisado bruto contendo agarobiose **1b**. As condições de otimização foram detalhadas na Tabela 8. Essa otimização envolveu alterações na natureza e quantidades dos sais de amônio, tempo de reação e concentração do meio reacional. Durante o curso das reações para obtenção deste produto observou-se a formação dos subprodutos **4**, **5** e **6**, os quais puderam ser detectados por CCD e espectrometria de massas da mistura reacional. A Figura 21 é um exemplo de espectrometria de massas onde todos esses subprodutos puderam ser detectados no meio reacional. Nesse exemplo, empregou-se cloreto de amônio como fonte de amônia para reação de aaminação redutiva (Entrada 6).

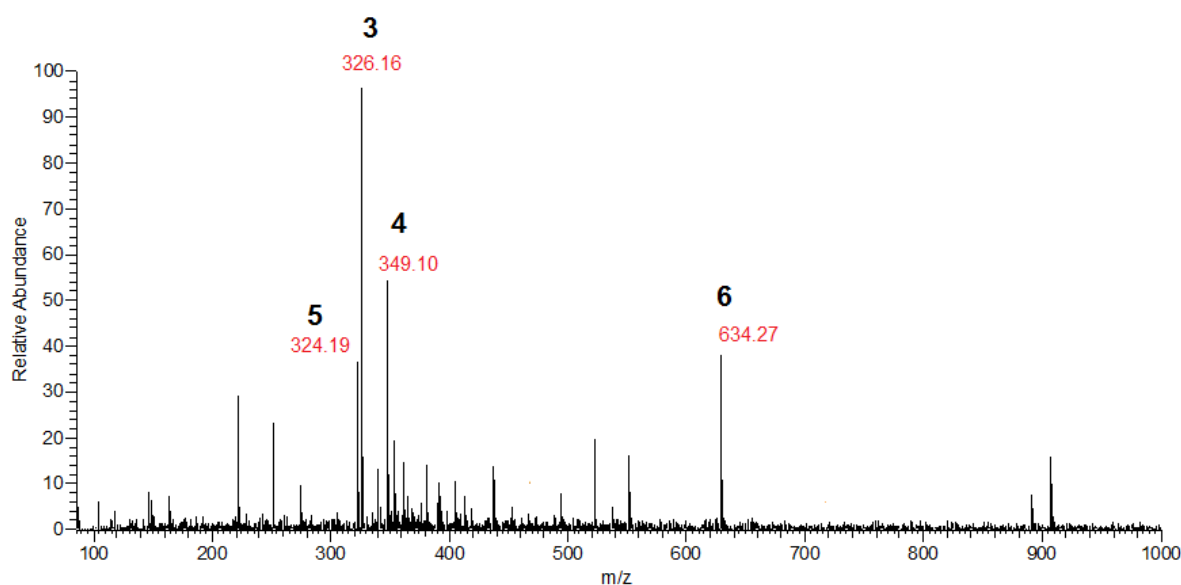
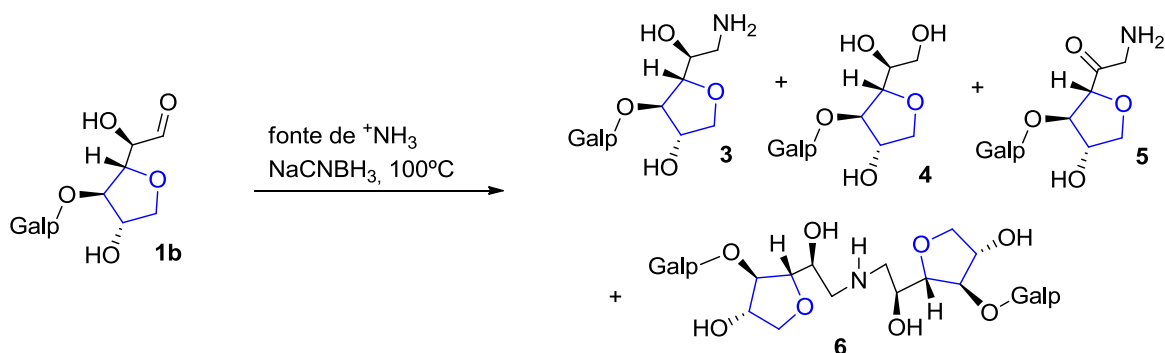


Figura 21: Espectrometria de massas do meio reacional da aminação redutiva com NH_4Cl (Entrada 6, Tabela 8). Composto **3**: LRMS m/z calc. $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{NO}_9^+$: 326,1451; encontrado: 326,16. Composto **4**: LRMS m/z calc. $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{NaO}_{10}^+$: 349,1105; encontrado: 349,10. Composto **5**: LRMS m/z calc. $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{NO}_9^+$: 324,1289; encontrado: 324,19. Composto **6**: LRMS m/z calc. $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{NO}_{18}^+$: 634,2553; encontrado: 634,27.

O alditol **4** foi resultado da inespecificidade do agente redutor cianoboro-hidreto em reduzir iminas e aldeídos (BAXTER; REITZ, 2004); o subproduto **5** foi resultado de enolização e rearranjo dos intermediários de reação (também conhecido como produto de Amadori) (COSENZA; NAVARRO; STORTZ, 2011); e o subproduto **6** foi resultado de um ataque nucleofílico sequencial no produto já formado no meio reacional.

Conforme é demonstrado na Tabela 8, o surgimento do subproduto **4** (alditol) não pôde ser evitado em nenhuma das condições testadas. Já a formação do subproduto **5** (produto de Amadori) foi verificada apenas nas reações contendo sais de amônio inorgânicos (cloreto e sulfato de amônio) e, portanto, pode ser evitada utilizando-se sais orgânicos como fonte de amônia para a reação. A formação do subproduto **6** pôde ser evitada com o aumento da concentração do sal de amônio (maior excesso do nucleófilo) e a diluição do meio reacional (reduzindo os choques moleculares entre o produto **3** e o aldeído remanescente **1b**). O maior rendimento da reação foi atingido empregando as condições de síntese descritas na Entrada 9, sendo de 26% a partir da agarose **1**.

Tabela 8: Otimização da síntese da glicamina 3*

| Entrada | fonte de NH_3 | NH_3 (equiv.) | tempo (h) | [1b] (mmol.L^{-1}) | 4 ^b | 5 ^b | 6 ^b | Rendimento 3 ^c (%) |
|----------------|---------------------------------------|------------------------|-----------|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| 1 ^d | NH_4OH | 20 | 2 | 150 | √ | - | - | 0 |
| 2 | $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ | 20 | 2 | 150 | √ | - | √ | 5 |
| 3 | NH_4AcO | 20 | 2 | 150 | √ | - | √ | 12 |
| 4 | $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ | 20 | 2 | 150 | √ | - | √ | 10 |
| 5 | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 20 | 2 | 150 | √ | √ | √ | 7 |
| 6 | NH_4Cl | 20 | 2 | 150 | √ | √ | √ | 5 |
| 7 | NH_4AcO | 40 | 2 | 150 | √ | - | √ | 15 |
| 8 | NH_4AcO | 40 | 5 | 150 | √ | - | √ | 18 |
| 9 | NH_4AcO | 40 | 5 | 60 | √ | - | - | 26 |

*Todas as reações foram conduzidas em H_2O , com 100 mg de **1b**, em tubo selado, 100°C , 2 equiv. NaCNBH_3 e pH 11 ajustado com trietilamina (TEA). [**1b**]: concentração de **1b** no meio reacional em mmol.L^{-1} ; ^bPresença (√) ou ausência (-) dos subprodutos **4**, **5** ou **6**. Os subprodutos foram detectados na mistura reacional por CCD e caracterizados exclusivamente por espectrometria de massas de baixa resolução (LRMS). ^cRendimento após cromatografia em coluna de sílica. ^dpH > 12.

Um grande complicador das reações de aminação redutiva foi o processo de purificação dos produtos de reação. A metodologia de purificação teve impacto não somente na pureza final das amostras mas também nos rendimentos alcançados. Alguns testes para otimização do processo de purificação foram realizados (Tabela 9). Esses envolveram técnicas de cromatografia em coluna de sílica gel 60, cromatografia de troca iônica com resinas catiônica ou aniônicas e gel de troca catiônica fracamente ácido, ou combinação de métodos. A dificuldade na purificação do derivado **3** (assim com para as demais glicaminas) foi decorrente de três fatores: (1) as reações precisaram ser realizadas com enorme excesso de sais de amônio; (2) o produto apresentou afinidade pela sílica de fase normal, ficando retido ou arrastando durante a cromatografia e (3) o produto **3** e o subproduto **6** apresentaram perfis de eluição muito próximos. O grande excesso de íons no meio reacional ocasionou a saturação das resinas de troca catiônica, tornando os sítios de troca indisponíveis para a ligação com o composto de interesse, inviabilizando o seu uso para a purificação. O uso de resina de troca aniônica mostrou-se mais vantajoso. Ao remover os

íons acetato, o íon amônio pôde ser eliminado por evaporação sob pressão reduzida. Essa etapa foi essencial para conseguir maior rendimentos.

Na sequência, foram utilizadas as condições estabelecidas para síntese de **3** na síntese das glicaminas **7** e **8** (Esquema 7). Os rendimentos variaram de 19 a 30% e foram considerados satisfatórios, considerando-se que foram calculados a partir do polissacarídeo bruto agarose **1**.

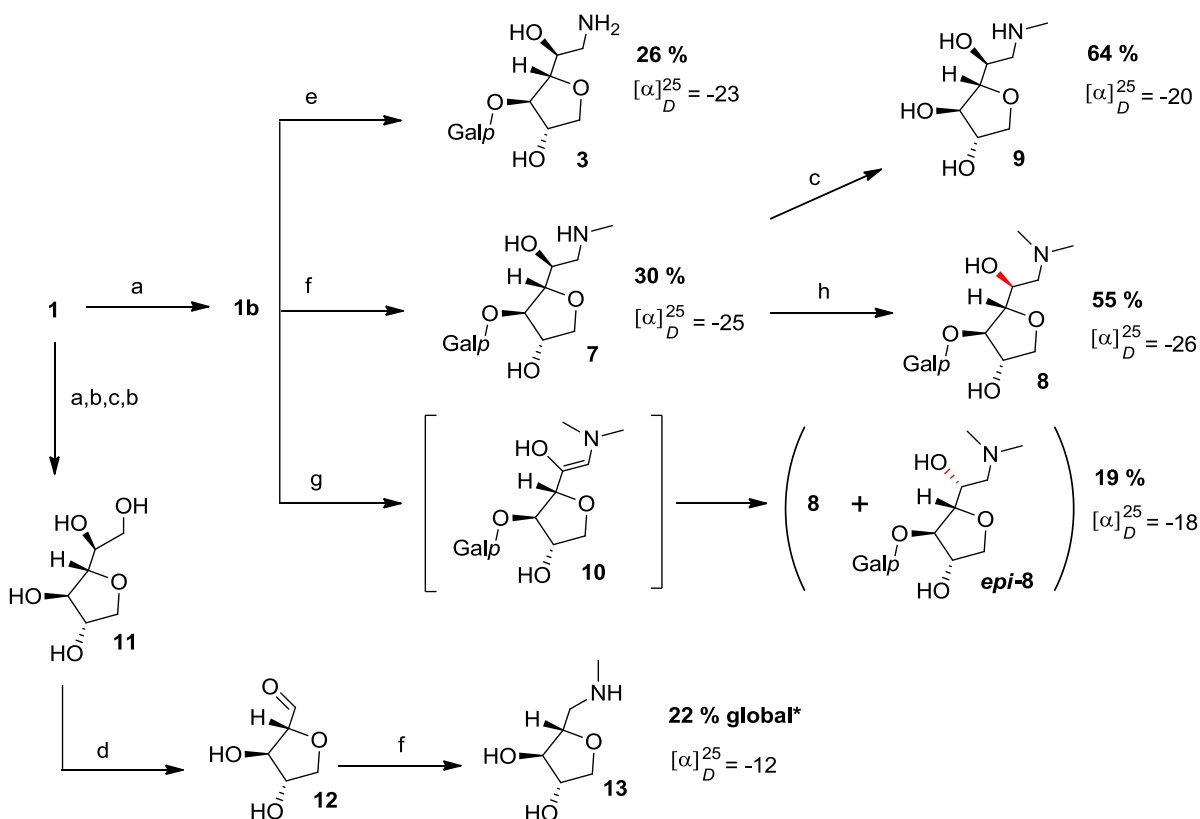
Tabela 9: Otimização dos métodos de purificação na síntese da glicamina **3***

| Entrada | Método de purificação | Rendimento 3 (%) |
|---------|---|-------------------------|
| 1 | Cromatografia em sílica gel 60 FM1 | ~4 ^a |
| 2 | Cromatografia em sílica gel 60 FM2 | ~2 ^a |
| 3 | Amberlite IRA120.H ⁺ + Cromatografia FM1 | ~2 ^a |
| 4 | Amberlite IRA120.NH ₄ ⁺ + Cromatografia FM1 | ~7 ^a |
| 5 | Amberlite IRA120.TEA ⁺ + Cromatografia FM1 | ~15 ^a |
| 6 | Amberlite IRA 410.OH ⁻ + Cromatografia FM1 | ~17 ^a |
| 7 | Amberlite IRA 410.OH ⁻ + Gel Sepharose CM-CL6B | ~5 ^a |
| 8 | Amberlite IRA 410.OH ⁻ + Cromatografia FM3 | 12 |

*Condições reacionais da entrada 3 na Tabela 8 - 20 equiv. NH₄AcO, 2 equiv. NaCNBH₃, 100°C, 2 h. FM = fase móvel ou sistema de eluição; FM1: AcOEt/MeOH/H₂O/AcOH 3:2:1:1. FM2: DCM/MeOH/NH₄OH 2 mol.L⁻¹ 3:3:1. FM3: MeOH/NH₄OH 2 mol.L⁻¹ 6:1. ^aPureza insatisfatória, avaliada por RMN de ¹H.

Na reação de aminação redutiva da agarobiose **1b** com dimetilamina foi obtida uma mistura de epímeros (**8** + *epi-8*), os quais diferem apenas na estereoquímica do carbono C2. Isso aconteceu pois, durante o curso da reação de aminação redutiva, ocorreu a formação do intermediário enamina **10** (Esquema 7). O espectro de RMN de ¹H da mistura sugere que foram formadas quantidades iguais (equimolares) de ambos os epímeros, podendo ser observados dois sinais distintos de N-CH₃ em 2,98 e 2,92 ppm, atribuídos para *epi-8* e **8**, respectivamente (Figura 22, espectro em vermelho e Tabela 10). Esse resultado demonstrou que mesmo com C2 proquiral em **10**, nenhuma indução interna gerou assimetria da reação (em outras palavras, a reação não foi diasterosseletiva).

Como um dos objetivos do trabalho é avaliar a influência da estereoquímica na atividade biológica destes compostos, foi elaborada uma estratégia para obtenção do epímero **8** puro. Isso foi realizado reagindo-se a glicamina **7** com formaldeído em condições de aminação redutiva. O composto **8** manteve a configuração original do material inicial do oligossacarídico, pois a reação ocorreu via intermediário imina ao invés de enamina. Os dados de rotação óptica específica ([α]_D) corroboram a obtenção de amostras distintas para reação de aminação redutiva empregando-se cloridrato de dimetilamina (reação via enamina) e a reação com formaldeído (via imina).



a. TFA 0,1 mol.L⁻¹, 80°C; **b.** NaBH₄; **c.** TFA 2 mol.L⁻¹, 110°C; **d.** NaIO₄; **e.** NH₄AcO, NaCNBH₃, pH 11, 100°C; **f.** HCl.NH₂Me, NaCNBH₃, pH 11, 100°C; **g.** HCl.NHMe₂, NaCNBH₃, pH 11, 100°C; **h.** HCHO, NaCNBH₃, pH 11, 100°C.

Esquema 7: Procedimentos de síntese, rendimentos e rotação óptica dos derivados **3**, **7**, **8**, **epi-8**, **9** e **13** via hidrólise parcial ou hidrólise redutiva da agarobiose **1**.

A inserção de grupos metila ao nitrogênio teve efeito no deslocamento dos sinais de RMN de ¹H (H-1a, H-1b, H-2, H-3) e pouco efeito nas constantes de acoplamento, podendo indicar pequenas mudanças conformacionais e de torção do anel tetra-hidrofurano (Tabela 10). Isso deve ser levado em consideração quando na análise da resposta biológica desses compostos. A conformação do anel tetra-hidrofurano afeta a energia de ligação das moléculas finais com o sítio de ligação no receptor alvo, porém o impacto que isso teria nos efeitos biológicos só poderá ser discutido frente aos resultados de estudos farmacológicos.

Tabela 10: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da unidade glicamínica dos compostos **3**, **7** e **8**

| Composto | 3 | | 7 | | 8 | |
|-------------------|----------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|
| Posição | $^1\text{H}^a$ | $^{13}\text{C}^b$ | $^1\text{H}^a$ | $^{13}\text{C}^b$ | $^1\text{H}^a$ | $^{13}\text{C}^b$ |
| 1 | 3,27 (dd, 3,6) | 42,9 | 3,28 (dd, 3,6) | 51,9 | 3,33 (m) | 59,7 |
| 1b | 3,12 (dd, 8,8) | 42,9 | 3,22 (dd, 9,0) | 51,9 | 3,33 (m) | 59,7 |
| 2 | 4,18 (dt, 3,6/8,8) | 67,2 | 4,24 (dt, 3,6/9,0) | 66,0 | 4,33 (dt, 3,9/9,2) | 64,9 |
| 3 | 3,87 (m) | 85,0 | 3,87 (m) | 84,3 | 3,84 (dd, 3,9/4,9) | 84,1 |
| 4 | 4,32 (ddd, 0,5/2,5/4,9) | 85,9 | 4,32 (ddd, 0,5/2,5/4,9) | 85,9 | 4,31 (ddd, 0,5/2,5/4,9) | 85,9 |
| 5 | 4,42 (dt, 2,5/4,7) | 76,0 | 4,42 (dt, 2,5/4,7) | 76,0 | 4,42 (dt, 2,5/4,7) | 76,0 |
| 6 ^a | 4,00 (dd, 4,7/10,2) | 73,8 | 4,00 (dd, 4,7/10,2) | 73,8 | 4,00 (dd, 4,7/10,2) | 73,8 |
| 6b | 3,88 (m) | 73,8 | 3,88 (m) | 73,8 | 3,88 (dd, 2,5/ 10,2) | 73,8 |
| N-CH ₃ | | | 2,77 (s) | 33,7 | 2,92 (s) | 42,0 |

^aAtribuição de sinais de RMN de ^1H (600 MHz, D₂O, pH 4). Valores dados em ppm (δ). Multiplicidade e constantes de acoplamento (J , em Hz) dados entre parênteses. ^bDeslocamentos químicos para ^{13}C (150 MHz) foram determinados por experimento bidimensional, mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C .

Para ampliar a biblioteca de compostos foram sintetizados outros dois derivados, compostos **9** e **13** (Esquema 7) sem a unidade de galactopirranose (unidade A, presente na estrutura nativa da agarose. A glicamina **9** foi sintetizada pela hidrólise da glicamina **7**. Essa hidrólise foi realizada com maior concentração de ácido e maior temperatura, uma vez que a ligação glicosídica 1'→4 é mais resistente que a ligação glicosídica 1→3' (previamente hidrolizada para formação de **1b**). Essa diferença na labilidade de hidrólise das ligações glicosídicas se deve ao enrigecimento e tensão aumentados no carbono anomérico da unidade B (3,6-anidrogactose) (BOCHKOV; ZAIKOV, 1979).

O derivado **13** foi obtido através da hidrólise redutiva de **1b**, seguida da clivagem oxidativa dos grupos hidroxila vicinais do composto **11** para obter o aldeído **12**, e finalmente aminação redutiva para obtenção da glicamina **13** (Esquema 7). O composto **13** apresenta um carbono hidroxilado a menos na cadeia lateral (entre o anel tetra-hidrofurano e o nitrogênio), consistindo em um composto chave para a compreensão da atividade dessa classe de moléculas. O mecanismo da reação de clivagem oxidativa catalisado por periodato é apresentado no Esquema 8. Essa reação ocorre via um intermediário cíclico (**11d**, **11e**) e gera a quebra da ligação C-C entre carbonos que possuam grupos hidroxila vicinais. Essa reação foi conduzida em temperatura controlada de 0°C e com tempo de reação de 5 min. Essas condições foram cruciais para evitar a abertura do anel tetra-

hidrofurano, uma vez que esse também apresenta grupos hidroxila vicinais. Os grupos hidroxila em C1 e C2 reagem mais facilmente devido à liberdade de rotação da ligação C-C que os separa. Isso facilita a formação do intermediário cíclico pois não impõe restrições na torção do anel formado. Por outro lado, os hidroxilas em C4 e C5 encontram-se em configuração *trans*, o que dificulta a formação do intermediário.

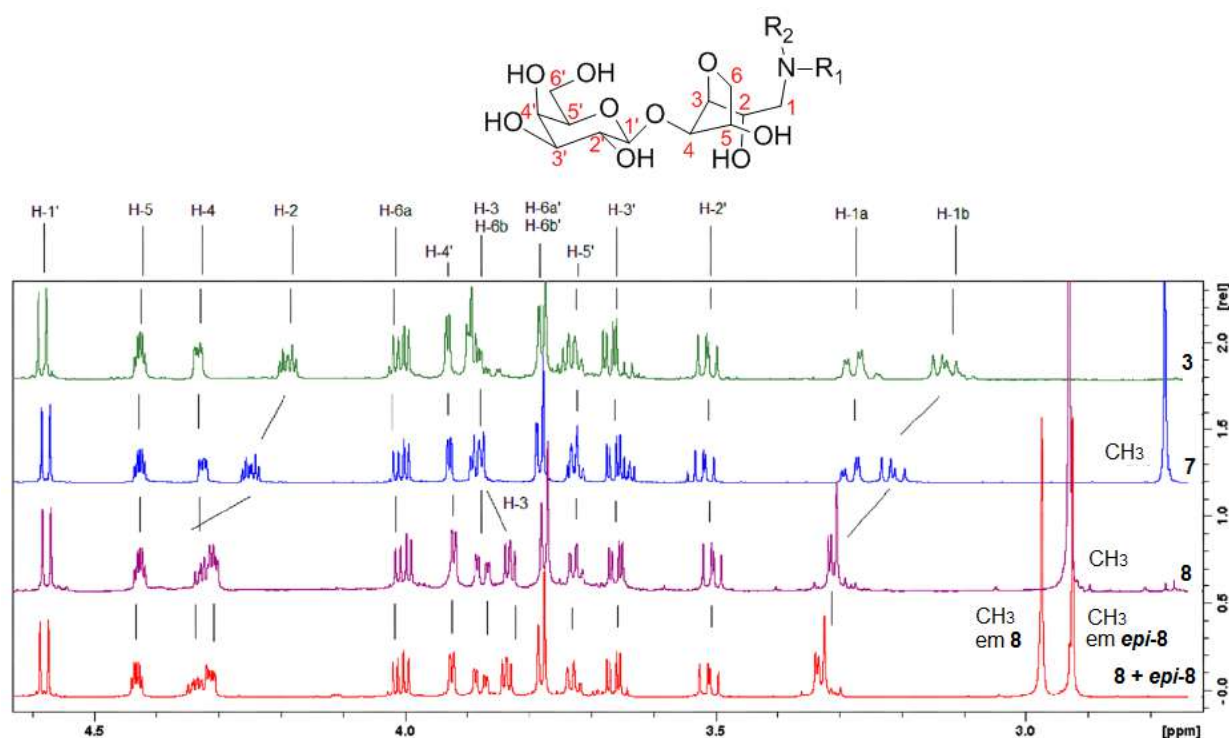
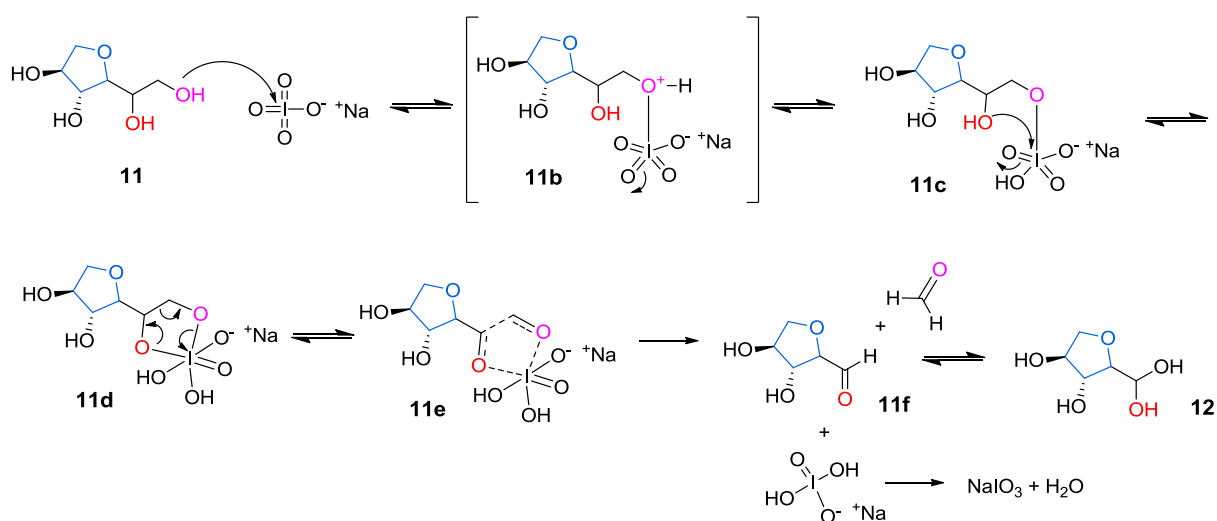


Figura 22: Espectros de RMN de ^1H das glicaminas **3**, **7**, **8** e *epi-8* (600 MHz, D_2O , pH 4.0). Composto **3** ($\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{H}$) em verde, **7** ($\text{R}_1 = \text{H}$, $\text{R}_2 = \text{Me}$) em azul, **8** e *epi-8* ($\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{Me}$); **8** em roxo e mistura equimolar de **8**+*epi-8* em vermelho.

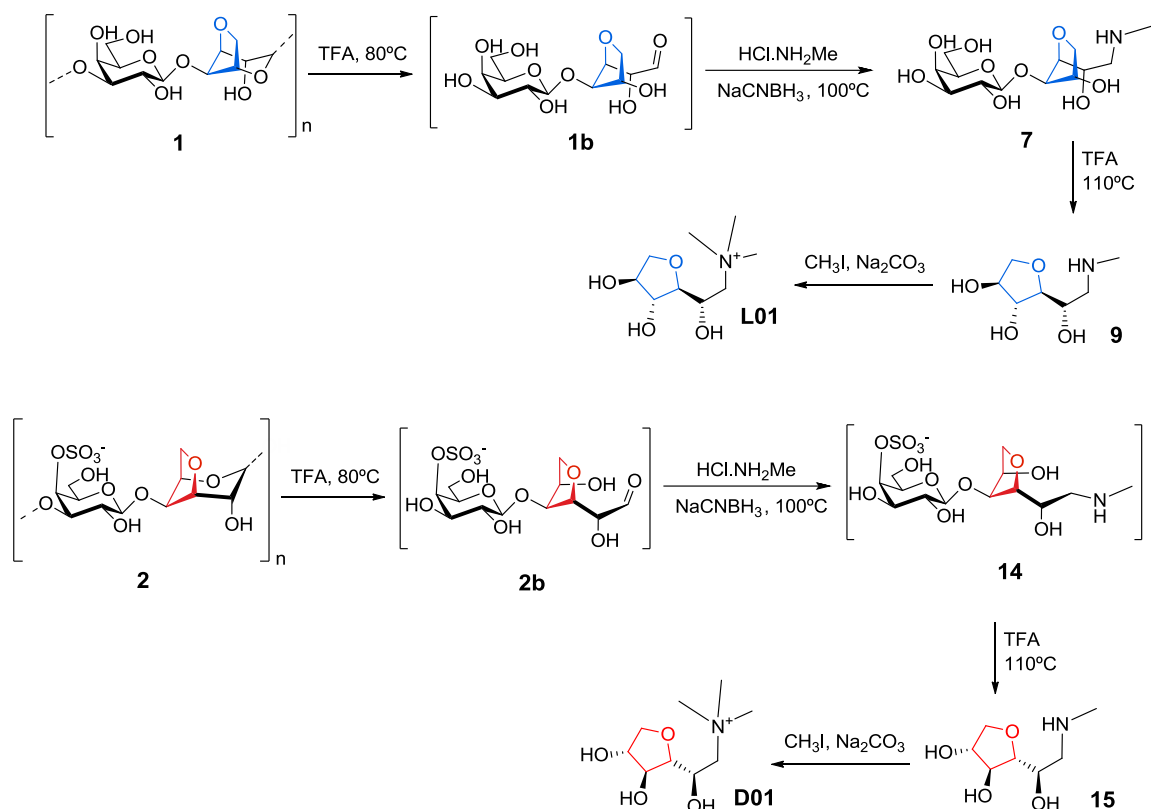


Esquema 8: Proposta de mecanismo da reação de clivagem oxidativa catalisada por periodato

Os resultados dessa seção foram publicados no artigo “*Aqueous semisynthesis of C-glycoside glycamines from agarose*” que encontra-se no Anexo 5 (pág. 193). A descrição detalhada dos procedimentos de síntese e caracterização completa dos compostos encontram-se no item 5.5 (pág 81).

5.3.2 Síntese dos derivados **L01** e **D01**

Após os procedimentos de síntese serem estabelecidos para obtenção das glicaminas **7** e **9**, aplicou-se metodologia similar para síntese das glicaminas **14** e **15** a partir do polissacarídeo *k*-carragenana (Esquema 9). A diferença se deu no processo de purificação destes compostos. O derivado **14** não foi isolado (não foi purificado por coluna de sílica). O processo típico de purificação envolveria o tratamento do material bruto da reação de aminação redutiva entre carrabiose **2b** e metilamina com resina aniônica e posterior purificação por cromatografia em coluna. Devido à natureza do oligossacarídeo formado (presença do íon sulfato), não foi plausível que se realizasse o processo de troca iônica, pois parte do material seria retido, juntamente com íons cloreto e outras impurezas do meio reacional. Considerando a experiência de purificação dos derivados **3** e **7**, (como mencionado no tópico anterior), a purificação somente em coluna de sílica também não seria uma boa alternativa devido ao grande excesso de sais no meio reacional. Alternativamente, a reação final de hidrólise (**14** → **15**) foi realizada sobre o material bruto. Após essa reação, a mistura foi tratada com resina aniônica. Esse processo foi bem-sucedido para purificação do material, uma vez que reteve-se não somente os íons cloreto (grande excesso vindo da reação de aminação redutiva), mas também a unidade sulfato-galactopirranose. Esse material foi submetido à cromatografia em sílica, onde percebeu-se maior facilidade na obtenção das frações cromatográficas puras. Isso ocorreu porque o material aplicado na coluna é uma mistura menos complexa, se comparada com a mistura reacional para obtenção do composto **9**. A maior facilidade na purificação traduziu-se na obtenção de um rendimento global maior. Enquanto que o rendimento de **9** a partir da agarobiose foi de 19,2%, o rendimento de **15** a partir da *k*-carragenana foi de 34%.



Esquema 9: Rota sintética para obtenção dos compostos **L01** e **D01**.

De posse dos materiais **9** e **15**, foram realizadas as reações de *N*-metilação ou quaternização. Um pequeno excesso (1,2 equiv.) de iodometano foi utilizado na reação, a qual foi realizada em metanol, iniciando-se a 0°C até que atingisse temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por CCD e monitorada até que houvesse o consumo dos materiais iniciais, o que se deu por volta de 20 h (reação *overnight*). Essa reação foi quimiosseletiva, não havendo indícios de *O*-metilação. Entende-se que o uso de uma base fraca (no caso, carbonato de sódio) previniu a desprotonação dos grupos hidroxila. Assim, não houve formação de grupos alcóxido e, portanto, as hidroxilas não foram nucleófilos suficientemente fortes para o ataque ao iodometano. O uso de bases mais fortes (como por exemplo, NaH) e meio reacional composto por solvente polar aprótico (como por exemplo DMF ou acetonitrila) teriam o efeito oposto, favorecendo a *O*-metilação em detrimento da *N*-metilação (MARTINS et al., 2014).

Os produtos formados revelaram apenas fracamente com orcinol e ninhidrina na CCD e não foram eluídos por nenhum dos sistemas de solventes testados (MeOH/NH₄OH 2 mol.L⁻¹ 1:1; H₂O; MeOH/H₂O/AcOH 3:1:1). A purificação dos materiais foi realizada por gel de troca catiônica, empregando-se CM Sepharose CL-6B (fracamente ácida). A coluna foi eluída com uma solução (NH₄)₂CO₃ 1 mol.L⁻¹ e NH₄OH 1 mol.L⁻¹ (pH 10) e lavada com água

Milli-Q até condutividade estável. A seguir o material foi colocado na coluna e eluído por solução de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 10, ajustado com NH_4OH).

Os compostos **L01** e **D01** foram obtidos com rendimentos de aproximadamente 70% para etapa final (~13% de rendimento global). Apesar da identidade dos produtos ter sido verificada por RMN e espectrometria de massas, as amostras não foram obtidas com grau de pureza adequado (Figura 23), não possibilitando o cálculo exato do rendimento da reação. As impurezas presentes na amostra resultaram dois sinais adicionais no espectro de RMN os quais não puderam ser elucidados. A integração dos sinais de H-2 e dos hidrogênios da metila ($\text{N}-(\text{CH}_3)_3$) foi na proporção de 1:9 para ambos **L01** e **D01**, confirmando que não houve metilação adicional dos grupos hidroxilas da molécula. A inserção dos grupos metila teve influência no deslocamento químico dos sinais de RMN de ^1H para o H-1, H-2 e H-3, porém não houve a modificação da distorção do anel tetra-hidrofurano, haja vista os valores das constantes de acoplamento $J_{\text{H4-H3}}$ permaneceram praticamente inalteradas ($J_{\text{H4-H3}} = 4,47 \text{ Hz}$ em **9**; e $J_{\text{H4-H3}} = 4,50 \text{ Hz}$ em **L01**). Isso foi especialmente relevante, pois na etapa inicial de avaliação computacional dos compostos, foi constatado que a configuração e torção do anel tem impacto na estabilidade do complexo receptor-ligante. A atribuição dos sinais de RMN foi realizada através da comparação com o material inicial e confirmada por experimentos bidimensionais de HSQC. A atribuição de sinais e caracterização completa por RMN encontram-se no item 5.5 (pág. 81).

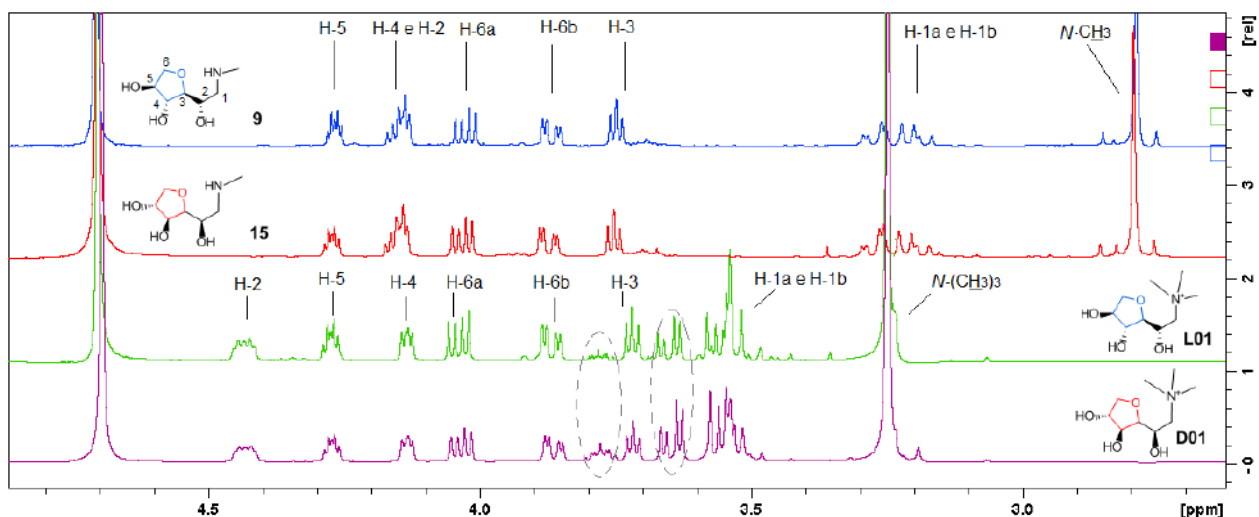


Figura 23: Comparação do RMN de ^1H dos compostos **9** (em azul), **15** (vermelho), **L01** (verde) e **D01** (roxo) (600 MHz, D_2O , pH 4,0). As linhas tracejadas destacam sinais que não pertencem aos compostos de interesse, considerados sinais de impureza.

5.3.3. Síntese dos derivados *N*-benzilados **L24**, **L25** e **L26**

Foram testadas algumas condições para otimização da síntese dos derivados *N*-benzilados **L24–26**. O material inicial utilizado para os teste de otimização foi o derivado β -D-galactopiranosil-(1'→4)-1-*N*-metilamino-1-desoxi- α -L-3,6-anidrogactose, glicamina **7**. O principal objetivo da otimização foi verificar os parâmetros necessários para que uma única alquilação acontecesse. Os produtos mono- e dibenzilados apresentaram características similares quanto ao R_f em sílica, dificultando a separação dos compostos. Porém, esses poderam ser facilmente diferenciados pela reação com ninhidrina (no caso das aminas terciárias, **L26**) ou dragendorff (no caso do sal de amônio quaternário, **subL26**). Para se obter a pureza adequada das amostras foi determinante a obtenção de maior proporção dos derivados de interesse em relação ao subproduto, no meio reacional. Na Tabela 11, está demonstrado que o controle do tempo, temperatura, excesso de agente alquilante e adição de base foram essenciais para a otimização da reação.

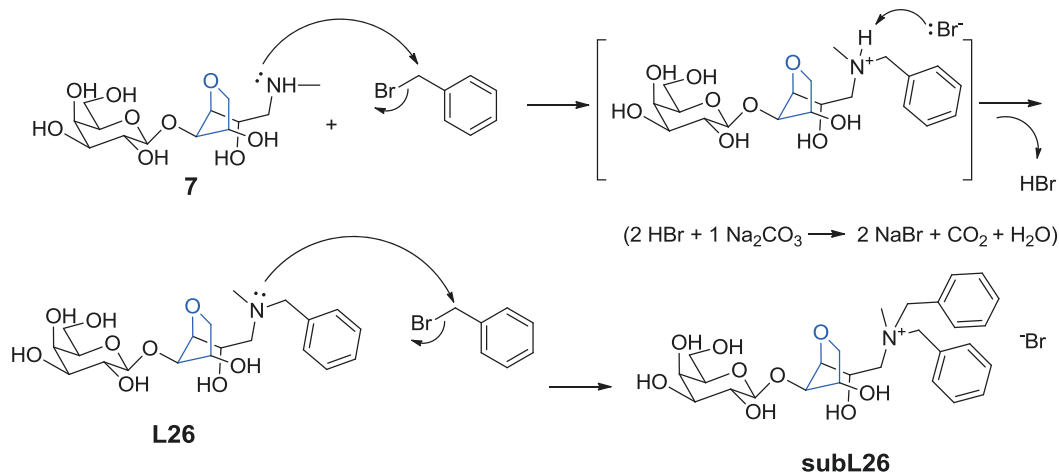
Tabela 11: Otimização da síntese de *N*-benzil-*N*-metil-glicamina **L26**

7 **L26** **subL26**

| Reação ^(a) | Solvente | BnBr (equiv.) | Tempo (h) | Base (equiv.) | Temperatura (°C) | Rendimento L26/SubL26 (%) |
|-----------------------|------------------|---------------|-----------|-------------------------------------|------------------|----------------------------------|
| 1 | DMF | 2 | 48 | TEA (2) | TA | 0 |
| 2 | MeOH | 2 | 48 | TEA (2) | TA | 0 |
| 3 | MeOH/Dioxano 1:1 | 2 | 5 | TEA (2) | TA | 5/12 |
| 4 | AcCN | 2 | 5 | TEA (2) | TA | 6/20 |
| 5 | AcCN/MeOH 2:1 | 2 | 5 | TEA (2) | TA | 10/22 |
| 6 | AcCN/MeOH 2:1 | 1,2 | 5 | TEA (2) | 0 | 5/15 |
| 7 ^b | AcCN/MeOH 2:1 | 1,2 | 6 | Na ₂ CO ₃ (2) | 0 | 30/12 |
| 8 ^c | AcCN/MeOH 2:1 | 1,2 | 6 | Na ₂ CO ₃ (3) | 0 | 45/7 |

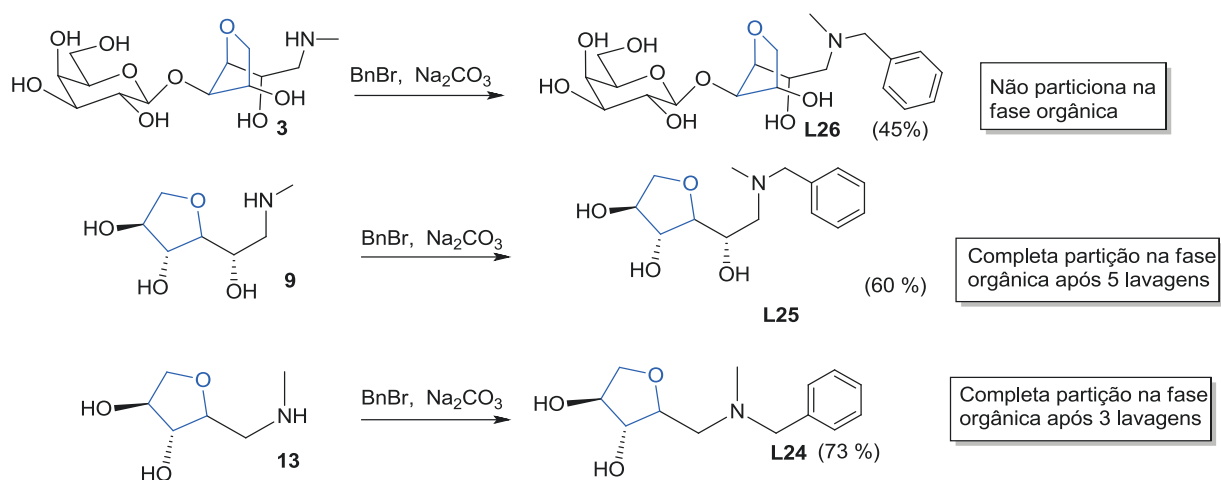
^a Reações realizadas na escala de 100 mg, com 10 mL de solvente. ^b A reação foi interrompida quando observou-se consumo completo do material inicial. ^c A reação foi interrompida quando detectou-se a presença do **SubL26**. TEA: trietilamina. TA: temperatura ambiente.

De maneira semelhante às reações de *N*-metilação, essas reações de *N*-alquilação também foram quimiosseletivas (não houveram indícios de *O*-benzilação). No entanto, tais reações foram de difícil controle para obtenção dos derivados monobenzilados em detrimento dos derivados dibenzilados. No Esquema 10 está demonstrado o mecanismo de reação proposto para essas reações, onde pode-se observar a formação dos derivados **L26** e **subL26** consecutivamente durante o curso da reação. Trata-se de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular na qual ocorre a formação de ácido bromídrico. Além da formação do subproduto dibenzilado observou-se, por CCD, a hidrólise do material inicial com o aparecimento de galactose no meio reacional, devido ao ácido formado. Isso explicou o baixo rendimento da reação delinada na Entrada 7 da Tabela 11, mesmo com o consumo total do material inicial. Na reação referente a Entrada 8, um maior excesso de base foi utilizado (para evitar hidrólise do material) e a mesma foi interrompida antes do consumo total do material inicial para facilitar a etapa de purificação. Esta estratégia mostrou-se vantajosa quando se comparam os rendimentos obtidos anteriormente.



Esquema 10: Proposta de mecanismo de reação para *N*-benzilação

A metodologia estabelecida nessa otimização foi aplicada então para a síntese dos outros dois derivados **L25** e **L24**, a partir das glicaminas **9** e **13** respectivamente (Esquema 11). As reações foram conduzidas até consumo completo do material inicial. Como era esperado, houve formação de subprodutos dibenzilados nas reações em questão, porém uma extração líquido-líquido foi capaz de separar os compostos **L24** e **L25** (fase orgânica) dos seus respectivos subprodutos quaternizados dibenzilados (fração aquosa). Essa separação não pode ser realizada no caso da síntese de **L26** uma vez que este composto não particionou na fração orgânica devido ao número de grupos hidroxila da molécula, o que a torna muito polar. O detalhamento dos procedimentos de síntese e caracterização dos produtos e subprodutos podem ser consultados no item 5.5 (pág 81).



Esquema 11: Síntese dos derivados *N*-benzilados.

5.4 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS DERIVADOS N-BENZILADOS

Os compostos **L24–L26** foram avaliados *in vitro* para verificar sua capacidade de potencializar a ação do ligante ortostérico endógeno (no caso, ACh) em receptores muscarínicos do subtipo M₁. Compostos que apresentam essa atividade são conhecidos como moduladores alostéricos positivos (ou PAMs). Nenhum dos derivados glicídicos foi capaz de gerar a resposta esperada para PAMs nas concentrações usuais de 1 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Os resultados podem ser observados nos gráficos da Figura 24. O acúmulo de IP₁ aumenta na presença de um PAMs, refletindo a potencialização da ação da ACh. Nos gráficos a seguir a resposta é dada em termos de estímulo máximo gerado pela ACh. Nas barras cinza dos gráficos na Figura 24, pode-se observar que o PAM de referência (BQCA) foi capaz de aumentar a resposta da ACh na concentração de 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Emáx ACh próximo a 100%). Já os compostos **L24–L26** não foram capazes de gerar a mesma resposta. Não houveram diferenças significativas nos valores de estimulação da ACh na ausência (barras lilás) ou presença dos compostos teste (barras laranjas e pretas). No ensaio com o composto **L24**, verificou-se uma pequena queda dos valores de Emáx da ACh, o que pode refletir a toxicidade desse composto. Tais resultados inviabilizaram a continuidade do estudo destes derivados como moduladores alostéricos.

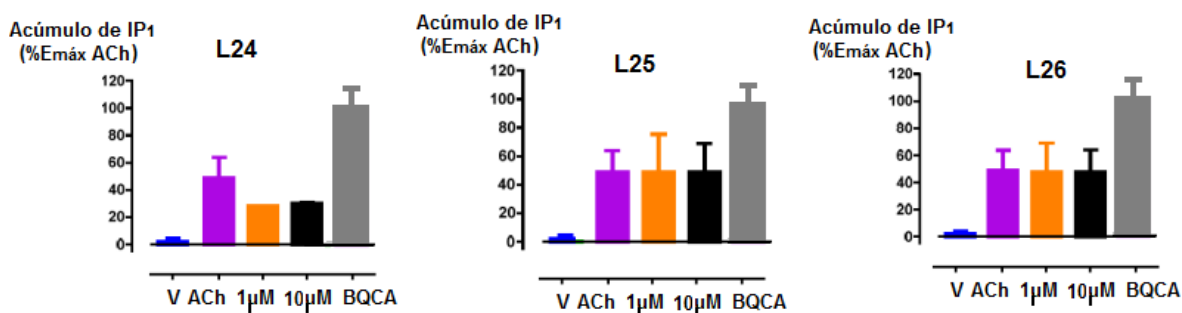


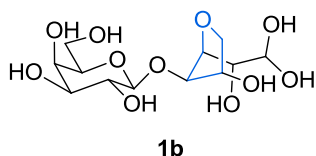
Figura 24: Quantificação de IP₁ (mio-inositol 1-fosfato) expresso em porcentagem do máximo de estímulo gerado pela ação da acetilcolina (Emáx ACh) em células CHO, expressando seletivamente M₁-mAChR humanos. **V:** veículo (controle negativo); **ACh:** resposta gerada pela ACh na concentração de 3,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. **1 μM :** 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ do composto teste + 3,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de ACh. **10 μM :** 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ do composto teste + 3,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de ACh. **BQCA:** 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de BQCA + 3,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de ACh (controle positivo).

O aproveitamento destas moléculas inéditas **L24–L26** e os respectivos subprodutos **subL24–subL26** para outros propósitos terapêuticos e tecnológicos foi considerado. Os derivados *N*-benzilados apresentam potencial como inibidores de glicosidases para o tratamento de infecções fúngicas, bacterianas e virais ou ainda para o tratamento de

neoplasias (GUILLARME et al., 2010), dependendo da especificidade das moléculas para diferentes subtipos de hidrolases. Os derivados quaternizados dibenzilados apresentam características estruturais compatíveis para o seu uso como surfactantes glicídicos e potencialmente poderiam ser empregados como adjuvantes de transfecção de plasmídeos ou material para elaboração de sistemas de *DNA-delivery* em terapia gênica (LI et al., 2014; MISIAK et al., 2013).

5.5 PROCEDIMENTOS SINTÉTICOS E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

5.5.1 β -D-Galactopiranosil-(1'→4)-3,6-anidro- α -L-galactitol (agarobiose, **1b**)



Ágar tipo A (5 g) foi dissolvido em água destilada quente (450 mL, 90°C). A essa dispersão foi adicionada solução aquosa de TFA 1 mol.L⁻¹ (50 mL), perfazendo uma solução final a 0,1 mol.L⁻¹. A mistura permaneceu sob agitação a 80°C por 3 h. Ao término desse período, foi adicionado 500 mL de água destilada e a mistura foi resfriada até atingir TA. Na sequência esse material foi concentrado em rotaevaporador com pressão reduzida. O resíduo foi então redissolvido com 90 mL de água e adicionou-se 90 mL de álcool isopropílico, gerando um precipitado. Esse material foi filtrado a vácuo em funil com placa porosa nº 2. O filtrado foi seco em rotaevaporador, co-evaporado com metanol e liofilizado, gerando um pó fino levemente amarelado (4,8 g; 96% de rendimento p/p). Esse material foi assinalado conforme literatura de referência abaixo.

RMN de ¹³C (50 MHz, D₂O) δ (ppm) 102,4 (C1'), 89,9 (C1), 85,4 (C4), 82,8 (C3), 75,2 (C5'), 75,1 (C5), 73,0 (C6), 72,5 (C3'), 72,5 (C2), 70,5 (C2'), 68,6 (C4'), 60,9 (C6'). **HRMS:** m/z calculado para [M+K]⁺ C₁₂H₂₂O₁₁K⁺: 381,0799; encontrado: 381,0961. Para dados adicionais de caracterização referir-se a DUCATTI et al., 2011.

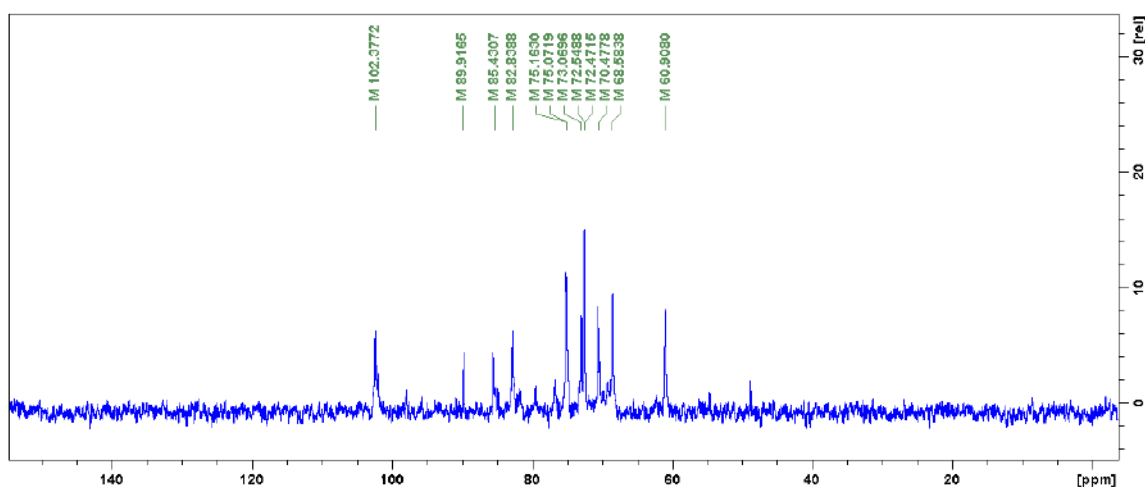
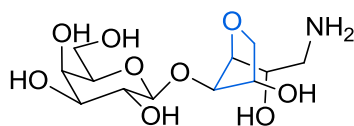


Figura 25: Espectro de RMN de ¹³C do composto **2** (50 MHz, D₂O).

5.5.2 β -D-Galactopiranosil-(1'→4)-1-amino-1-desoxi-3,6-anidro- α -L-galactitol **3**



3

O material bruto contendo agarobiose **2** (500 mg, ~1,5 mmol) foi dissolvido em água (20 mL), onde adicionou-se acetato de amônio (40 equiv.). A essa solução adicionou-se TEA para ajustar o pH para 11. Após, foi adicionado cianoboro-hidreto de sódio (200 mg, 2 equiv.) em única porção e o balão foi fechado imediatamente com septo de borracha. Essa mistura permaneceu sob agitação por 5 h em temperatura de refluxo (banho de glicerina, 100 °C). O meio reacional foi então concentrado em rotaevaporador, redissolvido com 100 mL de água e misturado com resina de troca aniônica (Amberlite IRA 410 - OH⁻, 100 mL, 68 g), permanecendo sob agitação por 1 h. A resina foi separada do material por filtração a vácuo e lavado com água (2 x 100 mL). O filtrado foi seco em rotaevaporador e co-evaporado com etanol, resultando um resíduo amarelado (material bruto 550 mg). Essa mistura foi então dissolvida em metanol a quente (50 mL) e filtrada em funil com placa porosa nº 2, resultando um resíduo amarelo-esverdeado após seco (330 mg). Finalmente, o material foi purificado por cromatografia em coluna de sílica (FM: MeOH/NH₄OH 2 mol.L⁻¹ 6:1), resultando um sólido branco após seco e liofilizado (142 mg, 26% de rendimento).

$[\alpha]_D$: -23,0 (c 1,0, H₂O). **RMN de ¹H** (600 MHz, D₂O, pH 4,0) δ (ppm) 4,57 (d, $J_{H1'-H2'} = 7,8$ Hz, 1H, H1'), 4,42 (dt, $J_{H5-H4} = 2,5$ Hz, $J_{H5-H6a} = 4,7$ Hz, 1H, H5), 4,32 (ddd, $J = 0,5$ Hz, $J_{H4-H5} = 2,5$ Hz, $J_{H4-H3} = 4,9$ Hz, 1H, H4), 4,18 (dt, $J_{H2-H3} = 3,6$ Hz, $J = 8,8$ Hz, 1H, H2), 4,00 (dd, $J_{H6a-H5} = 4,7$ Hz, $J_{H6a-H6b} = 10,2$ Hz, 1H, H6a), 3,92 (dd, $J_{H4'-H5'} = 0,7$ Hz, $J_{H4'-H3'} = 3,4$ Hz, 1H, H4'), 3,88 (m, 1H, H6b), 3,87 (m, 1H, H3), 3,78 (dd, $J_{H6'-H5'} = 5,9$ Hz, 2H, H6a' e H6b'), 3,71 (m, 1H, H5'), 3,66 (dd, $J_{H3'-H4'} = 3,4$ Hz, $J_{H3'-H2'} = 9,9$ Hz, 1H, H3'), 3,51 (dd, $J_{H2'-H1'} = 7,8$ Hz, $J_{H2'-H3'} = 9,9$ Hz, 1H, H2'), 3,27 (dd, $J = 3,6$ Hz, 1H, H1a), 3,12 (dd, $J_{H1b-H2} = 8,8$ Hz, 1H, H1b). **RMN de ¹³C** (150 MHz, D₂O, pH 4,0) δ (ppm) 103,0 (C1'), 85,9 (C4), 85,0 (C3), 76,2 (C5'), 76,0 (C5), 73,8 (C6), 73,3 (C3'), 71,4 (C2'), 69,4 (C4'), 67,2 (C2), 62,0 (C6'), 42,9 (C1). **HRMS**: m/z calculado para $[M+H]^+$ C₁₂H₂₄NO₉⁺: 326,1451; encontrado: 326,1469.

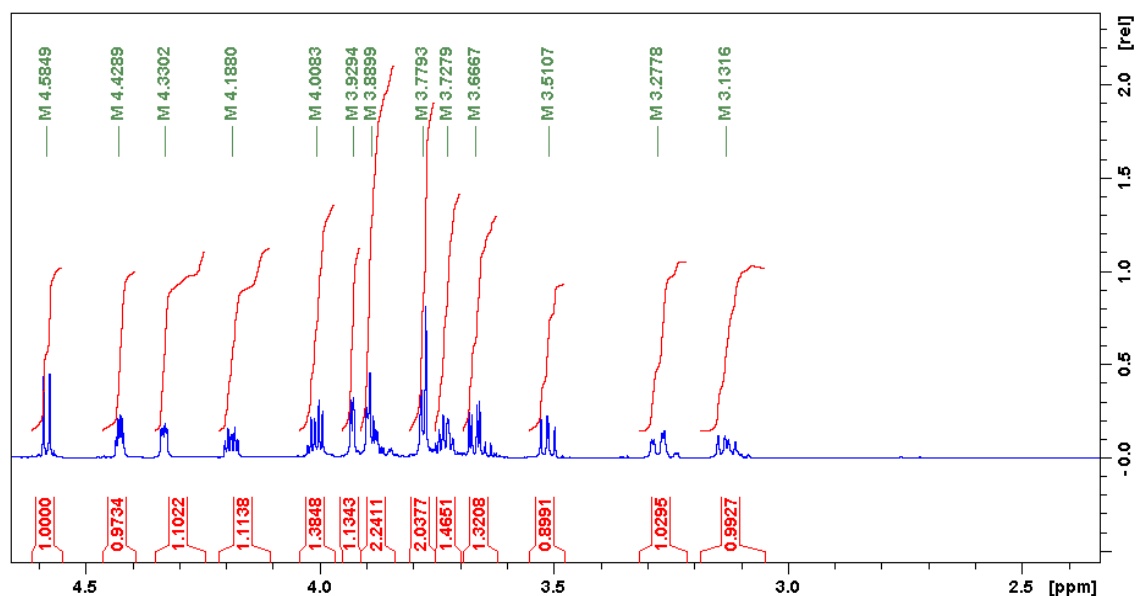


Figura 26: Espectro de RMN de ^1H do composto **3** (600 MHz, D_2O , pH 4,0).

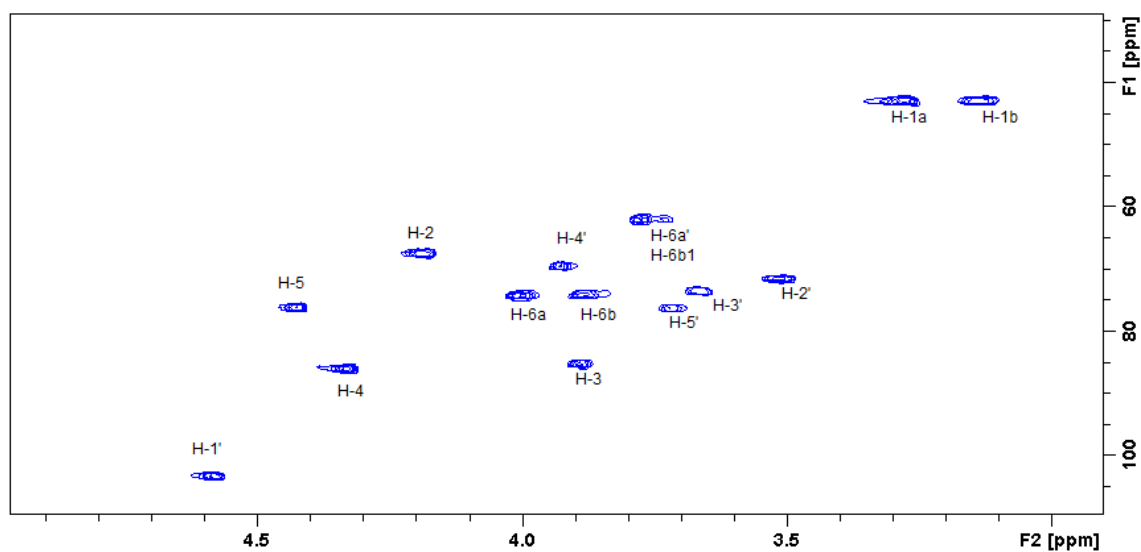
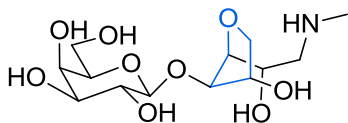


Figura 27: Mapa de correlação de HSQC ^1H - ^{13}C do composto **3** (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , D_2O , pH 4,0).

5.5.3 β -D-Galactopiranosil-(1'→4)-1-(*N*-metilamino)-1-desoxi-3,6-anidro- α -L-galactitol **7**

**7**

O material bruto contendo agarobiose **2** (500 mg, ~1,5 mmol) foi dissolvido em água (20 mL), onde adicionou-se cloridrato de metilamina (20 equiv.; 2,0 g). A essa solução adicionou-se TEA para ajustar o pH para 11. Após foi adicionado cianoboro-hidreto de sódio (200 mg, 2 equiv.) em única porção e o balão foi fechado imediatamente com septo de borracha. Essa mistura reagiu sob agitação por 5 h em temperatura de refluxo (banho de glicerina, 100°C). A separação do produto do meio reacional e a purificação foram realizados da mesma maneira que para o composto **3**. Após cromatografia e liofilização foi obtido um sólido branco (150 mg, 30% de rendimento).

$[\alpha]_D$: -25,0 (c 1,0, H₂O). **RMN de ¹H** (600 MHz, D₂O, pH 4,0) δ (ppm) 4,57 (d, $J_{H1'-H2'} = 7,8$ Hz, 1H, H1'), 4,42 (dt, $J_{H5-H4} = 2,5$ Hz, $J_{H5-H6a} = 4,7$ Hz, 1H, H5), 4,32 (ddd, $J = 0,5$ Hz, $J_{H4-H5} = 2,5$ Hz, $J_{H4-H3} = 4,9$ Hz, 1H, H4), 4,24 (dt, $J_{H2-H3} = 3,6$ Hz, $J_{H2-H1a} = 9,0$ Hz, 1H, H2), 4,00 (dd, $J_{H6a-H5} = 4,7$ Hz, $J_{H6a-H6b} = 10,2$ Hz, 1H, H6a), 3,92 (dd, $J_{H4'-H5'} = 0,7$ Hz, $J_{H4'-H3'} = 3,4$ Hz, 1H, H4'), 3,88 (m, 1H, H6b), 3,87 (m, 1H, H3), 3,78 (dd, $J_{H6'-H5'} = 5,9$ Hz, 2H, H6a-b'), 3,71 (m, 1H, H5'), 3,66 (dd, $J_{H3'-H4'} = 3,4$ Hz, $J_{H3'-H2'} = 9,9$ Hz, 1H, H3'), 3,51 (dd, $J_{H2'-H1'} = 7,8$ Hz, $J_{H2'-H3'} = 9,9$ Hz, 1H, H2'), 3,28 (dd, $J_{H1a-H2} = 3,6$ Hz, 1H, H1a), 3,22 (dd, $J_{H1b-H2} = 9,0$ Hz, 1H, H1b), 2,77 (s, 1H, CH₃). **RMN de ¹³C** (150 MHz, D₂O, pH 4,0) δ (ppm) 103,0 (C1'), 85,9 (C4), 84,3 (C3), 76,2 (C5'), 76,0 (C5), 73,8 (C6), 73,3 (C3'), 71,4 (C2'), 69,4 (C4'), 66,0 (C2), 62,0 (C6'), 51,9 (C1), 33,7 (CH₃). **HRMS**: m/z calculado para [M+H]⁺ C₁₃H₂₆NO₉⁺: 340,1608; encontrado: 340,1631.

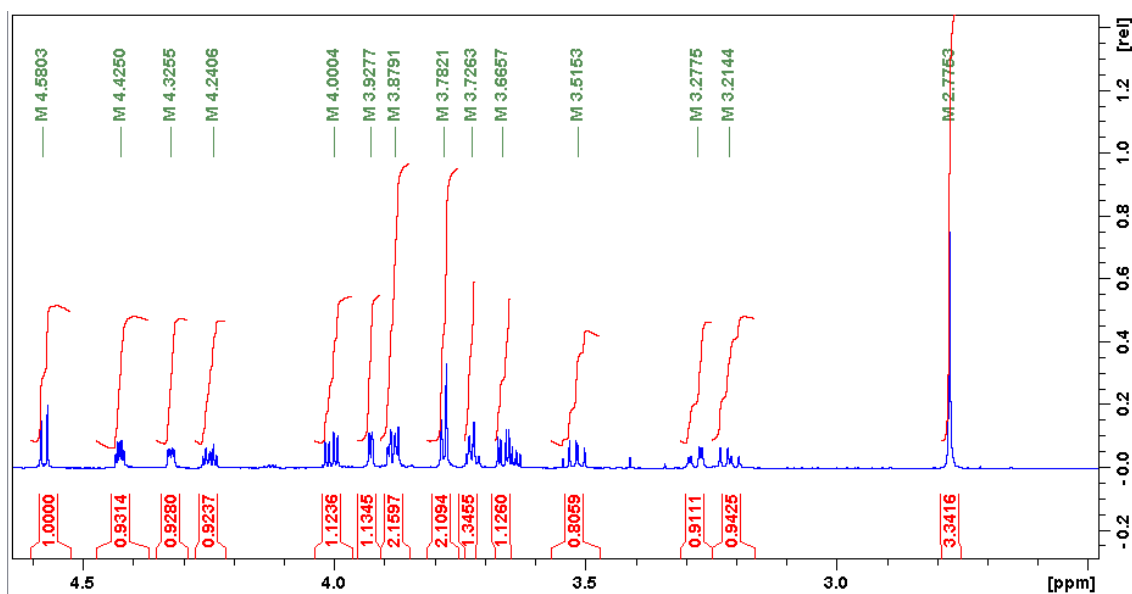


Figura 28: RMN de ^1H do composto **7** (600 MHz, D_2O , pH 4,0).

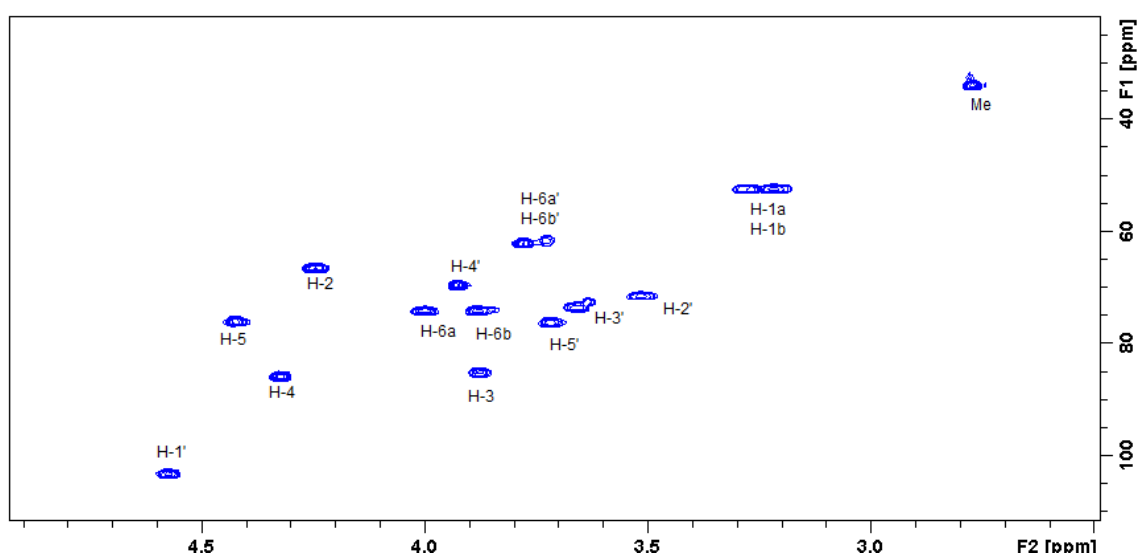
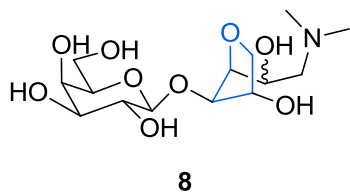


Figura 29: Mapa de correlação de HSQC ^1H - ^{13}C do composto **7** (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , D_2O , pH 4,0).

5.5.4 β -D-Galactopiranosil-(1'→4)-1-(*N,N*-dimetilamino)-1-desoxi-3,6-anidro- α -L-galactitol **8**



*Método A – Mistura equimolar de **8** + epi-**8***

O material bruto contendo agarobiose **2** (500 mg; ~1,5 mmol) foi dissolvido em água (20 mL), onde adicionou-se cloridrato de dimetilamina (8,5 equiv.; 1,0 g). A essa solução adicionou-se TEA para ajustar o pH para 11. Após foi adicionado cianoboro-hidreto de sódio (200 mg, 2 equiv.) em única porção e o balão foi fechado imediatamente com septo de borracha. Essa mistura reagiu sob agitação por 5 h em temperatura de refluxo (banho de glicerina, 100°C). A separação do produto do meio reacional e a purificação foram realizados da mesma maneira que para o composto **3**. Após cromatografia e liofilização foi obtido um sólido branco correspondente à mistura de epímeros (100 mg, 19% de rendimento).

*Método B – Composto **8** puro*

Metilaminoglicamina **7** (40 mg, 0,12 mmol) foi dissolvida em água (2 mL). A essa mistura adicionou-se solução aquosa de formaldeído 36% (3,0 equiv.; 0,36 mmol, 30 μ l). O pH foi ajustado para 11 com TEA e finalmente adicionou-se cianoboro-hidreto de sódio (15 mg; 2 equiv.) em única porção. O balão foi fechado imediatamente com septo de borracha. Essa mistura permaneceu sob agitação a 70°C por 5 h. A separação do produto do meio reacional e a purificação foram realizados da mesma maneira que para o composto **3**. Após cromatografia e liofilização foi obtido um sólido branco correspondente ao composto **8** puro (23 mg, 55% de rendimento a partir da agarobiose).

$[\alpha]_D$: -26,0 (c 1,0, H₂O) para o composto **8** puro; $[\alpha]_D$: -18,0 (c 1,0, H₂O) para mistura equimolar (**8** + epi-**8**). **RMN de ¹H** (600 MHz, D₂O, pH 4,0) δ (ppm) 4,57 (d, $J_{H1'-H2'} = 7,8$ Hz, 1H, H1'), 4,42 (dt, $J_{H5-H4} = 2,5$ Hz, $J_{H5-H6a} = 4,7$ Hz, 1H, H5), 4,33 (dt, $J_{H2-H3} = 3,9$ Hz, $J_{H2-H1a} = 9,2$ Hz, 1H, H2), 4,31 (ddd, $J = 0,5$ Hz, $J_{H4-H5} = 2,5$ Hz, $J_{H4-H3} = 4,9$ Hz, 1H, H4), 4,00 (dd, $J_{H6a-H5} = 4,7$ Hz, $J_{H6a-H6b} = 10,2$ Hz, 1H, H6a), 3,92 (dd, $J_{H4'-H5'} = 0,7$ Hz, $J_{H4'-H3'} = 3,4$ Hz, 1H, H4'), 3,88 (dd, $J_{H6b-H5} = 2,5$, $J_{H6b-H6a} = 10,2$, 1H, H6b), 3,84 (dd, $J_{H3-H4} = 4,9$ Hz, 1H, H3), 3,78 (dd, $J_{H6'-H5'} = 5,9$ Hz, 2H, H6a'/6b'), 3,71 (m, 1H, H5'), 3,66 (dd, $J_{H3'-H4'} = 3,4$ Hz, $J_{H3'-H2'} = 9,9$ Hz, 1H, H3'), 3,51 (dd, $J_{H2'-H1'} = 7,8$ Hz, $J_{H2'-H3'} = 9,9$ Hz, 1H, H2'), 3,33 (m, 2H, H1a e H1b), 2,98 (s, 3H, epi-**8** CH₃), 2,92 (s, 3H, composto **8** CH₃). **RMN de ¹³C** (150 MHz, D₂O, pH 4,0) δ (ppm) 103,0 (C1'), 85,9 (C4), 84,1 (C3), 76,2 (C5'), 76,0 (C5), 73,8 (C6), 73,3

(C3'), 71,4 (C2'), 69,4 (C4'), 64,9 (C2), 62,0 (C6'), 59,7 (C1), 45,0 (**epi-8** CH₃), 42,0 (composto **8** CH₃). **HRMS**: m/z calculado para [M+H]⁺ C₁₄H₂₈NO₉⁺: 354,1764; encontrado: 354,1764.

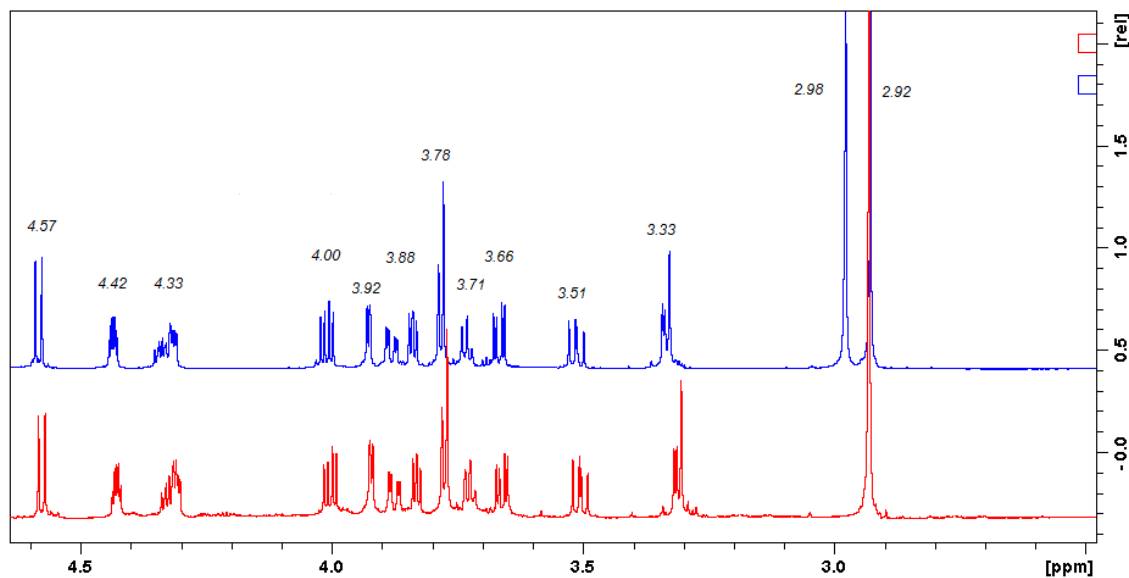


Figura 30: RMN de ¹H do composto **8** e **8 + epi-8** (600 MHz, D₂O, pH 4,0). Composto **8** puro em vermelho e mistura equimolar de **8** e **epi-8** em azul.

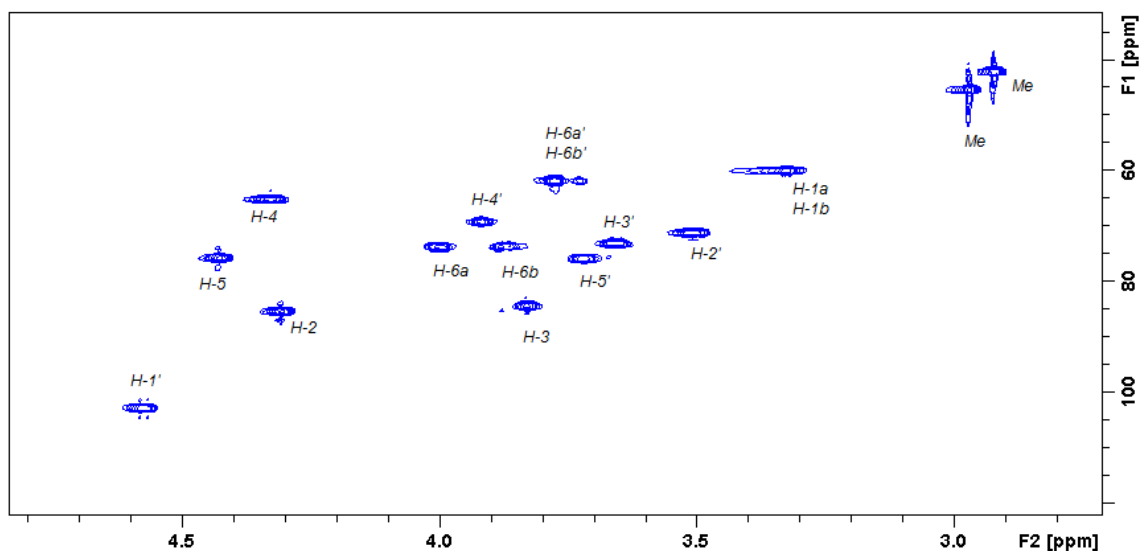
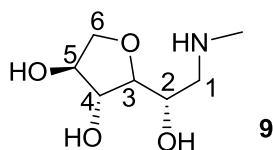


Figura 31: Mapa de correlação HSQC ¹H-¹³C da mistura **8 + epi-8** (600 MHz para ¹H e 150 MHz para ¹³C, D₂O, pH 4,0).

5.5.5 1-(*N*-Metilamino)-1-desoxi-3,6-anidro- α -L-galactitol **9** ou (3*R*,4*S*)-2-[(*S*)-1-hidroxi-2-(metilamino)etil]tetra-hidrofuran-3,4-diol



Metilaminoglicamina **7** (100 mg; 0,3 mmol) foi dissolvida em solução aquosa de TFA 2 mol.L⁻¹ (20 mL) e essa solução permaneceu sob agitação a 110°C por 3 h. A reação foi resfriada até atingir TA e diluída com 20 mL de água destilada. O resultante foi concentrado em rotaevaporador e co-evaporado com metanol, resultando um xarope âmbar. Finalmente, essa mistura foi purificada por cromatografia em coluna de sílica (eluente: MeOH/ NH₄OH 2 mol.L⁻¹ 6:1), resultando um sólido branco após seco e liofilizado (33 mg, 64% de rendimento)

[α]_D: -20,0 (c 1,0, H₂O). **RMN de ¹H** (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 4,25 (m, *J* = 2,6 Hz, 1H, H5), 4,13 (m, 2H, H2, H4), 4,01 (dd, *J* = 2,6/9,9, 1H, H6a), 3,85 (dd, *J* = 9,9, 1H, H6b), 3,73 (m, *J*_{H3-H4} = 4,4 Hz, 1H, H3), 3,27 (dd, *J* = 12,9 Hz, 1H, H1a), 3,15 (m, 1H, H1b), 2,77 (s, 3H, CH₃). **RMN de ¹³C** (100 MHz, D₂O) δ (ppm) 86,0 (C3), 78,7 (C4), 77,5 (C5), 73,5 (C6), 66,7 (C2), 52,1 (C1), 33,5 (CH₃). **HRMS**: *m/z* calculado para [M+H]⁺ C₇H₁₆NO₄⁺: 178,1079; encontrado: 178,1072.

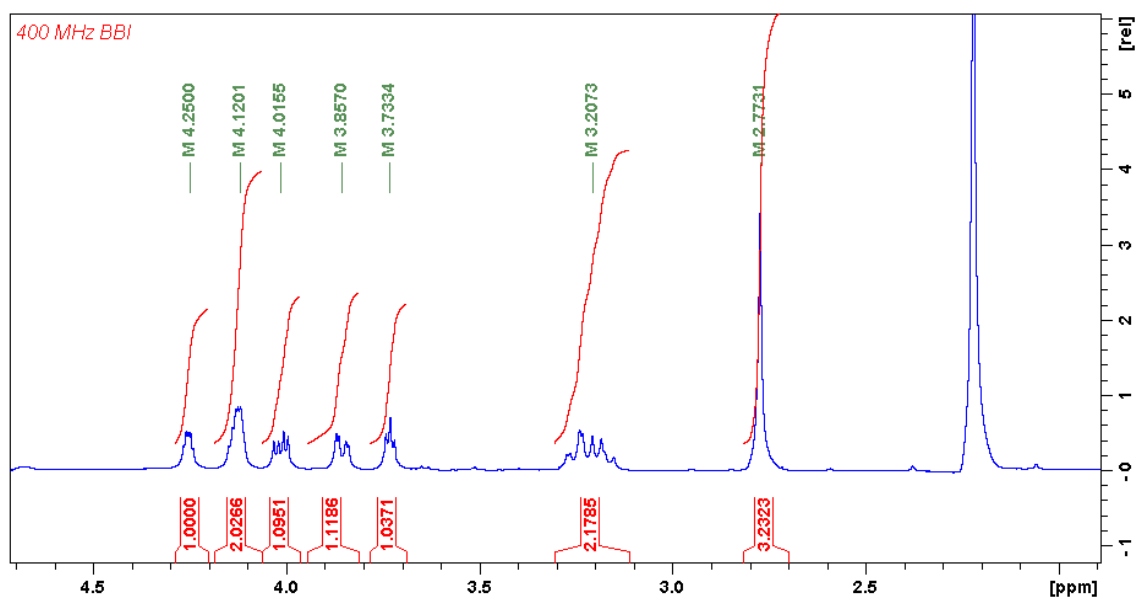


Figura 32: RMN de ^1H do composto **9** (400 MHz, D_2O , pH 4,0).

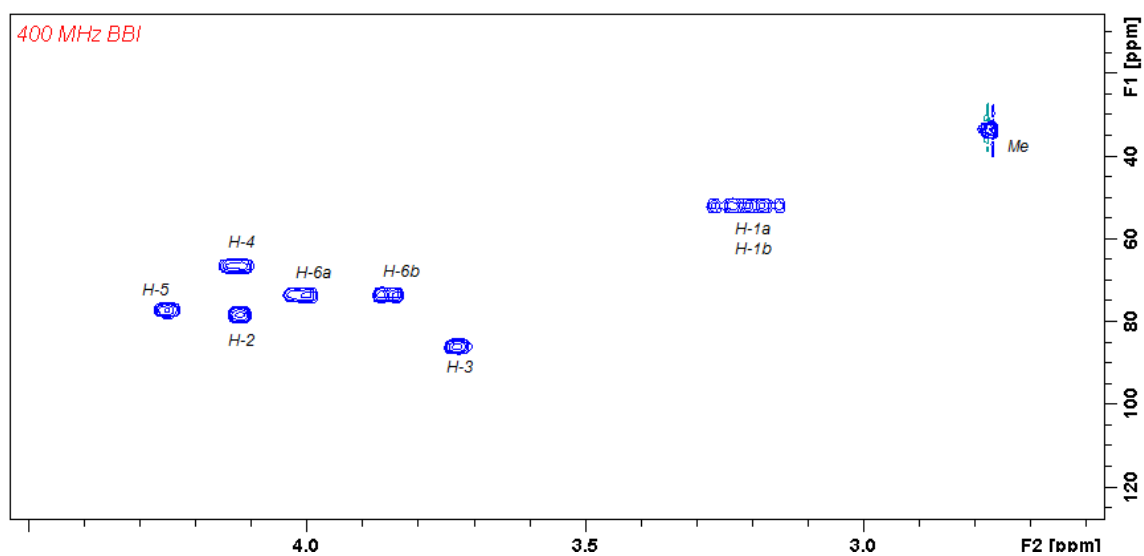
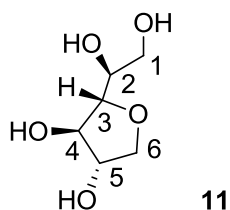


Figura 33: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do composto **9** (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , D_2O , pH 4,0).

5.5.6 3,6-Anidro-L-galactitol **11** ou (2S,3R,4S)-2-([(S)-1,2-dihidroxietil])tetrahidrofuran-3,4-diol



Ágar tipo A (5 g) foi dissolvido em água destilada quente (450 mL, 90 °C). A essa dispersão foi adicionada solução aquosa de TFA 1 mol.L⁻¹ (50 mL), perfazendo uma solução final a 0,1 mol.L⁻¹. A mistura permaneceu sob agitação a 80 °C por 3 h. Ao término desse período, foi adicionado 500 mL de água destilada e a mistura foi resfriada até atingir TA. Na sequência, esse material foi concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida. O resíduo foi então redissolvido com 50 mL de água e resfriado a 0°C em banho de água e gelo. Adicionou-se então boro-hidreto de sódio (0,95 g; 25 mmol) em única porção. Essa mistura permaneceu sob agitação por 1 h. Após foi adicionado ácido acético concentrado até ajuste de pH em 4 (4 mL) e a agitação continuou por mais 10 min. Esse material foi concentrado em rotaevaporador com pressão reduzida e co-evaporado com metanol, resultando um xarope amarelado. Esse material bruto foi submetido então a nova hidrólise, empregando solução de TFA 2 mol.L⁻¹ (125 mL). Essa mistura permaneceu sob agitação a 120°C por 3 h. Após, foi diluída com água (100 mL) e concentrada em rotaevaporador. A esse xarope acrescentou-se 50 mL de água. A solução foi resfriada a 0°C em banho de água e gelo. Adicionou-se então boro-hidreto de sódio (0,95 g; 25 mmol) em única porção, novamente. Essa mistura permaneceu sob agitação por 1 h. Após, foi adicionado ácido acético concentrado até ajuste de pH em 4 (4 mL) e a agitação continuou por mais 10 min. Esse material foi concentrado em rotaevaporador com pressão reduzida e co-evaporado com metanol, resultando um xarope marrom escuro. Esse material foi então ressuspenso em metanol (15 mL) e acetona (50 mL) e filtrado em funil de placa porosa nº 2. O resíduo foi seco e redissolvido com 50 mL de água, foi então tratado com resina de troca aniônica (Amberlite IRA 410 OH⁻, 100 mL) permanecendo sob agitação por 1 h. Após, a resina foi separada foi filtração e lavada com água destilada (200 mL). O filtrado foi seco em rotaevaporador, resultando um material bruto amarelado que continha principalmente o alditol **11** (1,5 g).

RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 4,22 (m, 1H, H5), 4,11 (m, 1H, H4), 3,99 (dd, $J = 4,6/10,0$ Hz, H6a), 3,82 (m, 2H, H2 and H6b), 3,72 (dd, $J = 4,9$ Hz, 1H, H3), 3,68 (m, 1H, H1a), 3,61 (m, 1H, H1b). **RMN de ^{13}C** (100 MHz, D_2O) δ (ppm) 85,3 (C-3), 78,9 (C-4), 77,6 (C-5), 73,3 (C-6), 71,9 (C-2), 63,6 (C-1). **HRMS:** m/z calculado para $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5\text{Na}^+$: 187,0582; encontrado: 187,0580.

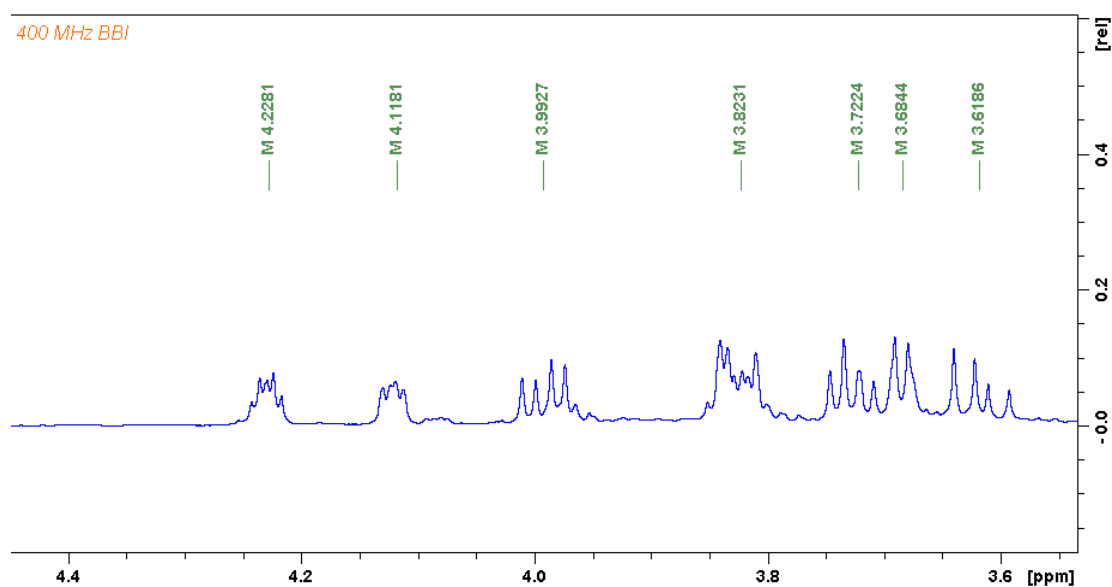


Figura 34: RMN de ^1H da material bruto contendo composto **11** (400 MHz, D_2O) .

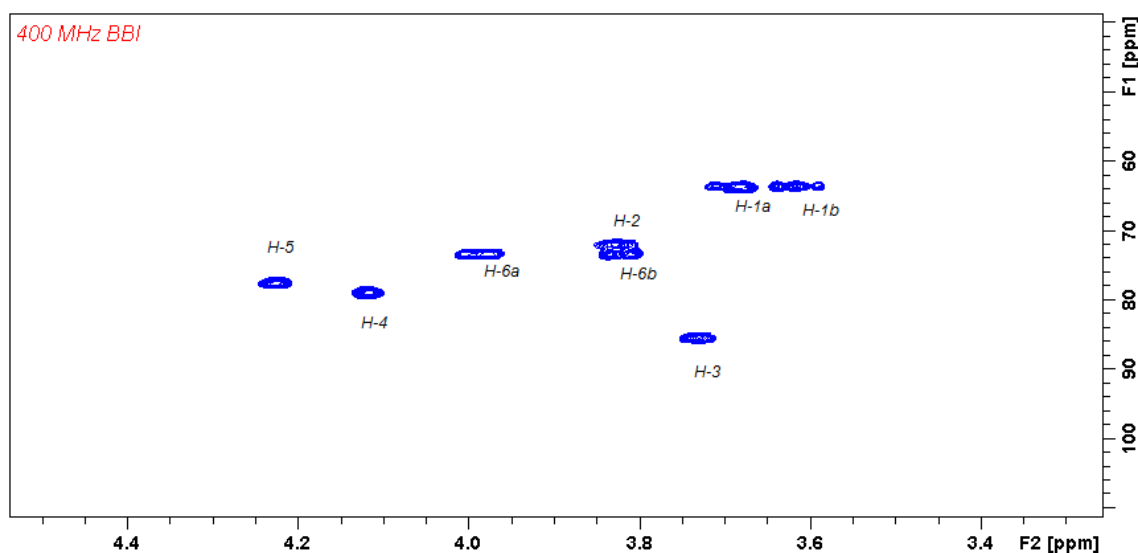
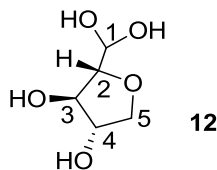


Figura 35: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do material bruto contendo **11** (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , D_2O).

5.5.7 2,5-Anidro-L-lixitol **12** ou (2R,3R,4S)-2-(di-hidroximetil)tetra-hidrofuran-3,4-diol

O alditol **11** (250 mg, ~1,5 mmol) foi dissolvido em água (3 mL) primeiro e então adicionou-se metanol (3 mL). Essa mistura foi resfriada a 0°C. Adicionou-se então metaperiodato de sódio (330 mg, 1,5 mmol) lentamente e sob agitação vigorosa. A reação foi monitorada por CCD (EtOAc/MeOH/H₂O 3:2:1) até consumo do material inicial. O meio reacional foi então filtrado em celite, lavado com metanol e seco em rotaevaporador. O material bruto obtido continha principalmente o composto **12**.

RMN de ¹H (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 5,05 (d, 6,2 Hz, 1H, H1), 4,22 (m, 1H, H4), 4,16 (b, 1H, H3), 4,00 (dd, *J* = 4,0/10,1, 1H, H5a), 3,86 (dd, *J* = 0,8/10,1 Hz, 1H, H5b), 3,65 (m, 1H, H2).

RMN de ¹³C (100 MHz, D₂O) δ (ppm) 89,9 (C-1), 87,9 (C-2), 78,2 (C-3), 77,1 (C-4), 73,5 (C-5). HRMS: *m/z* calculado para [M+K]⁺ C₅H₁₀O₅K⁺: 189,0165; encontrado: 189,0246.

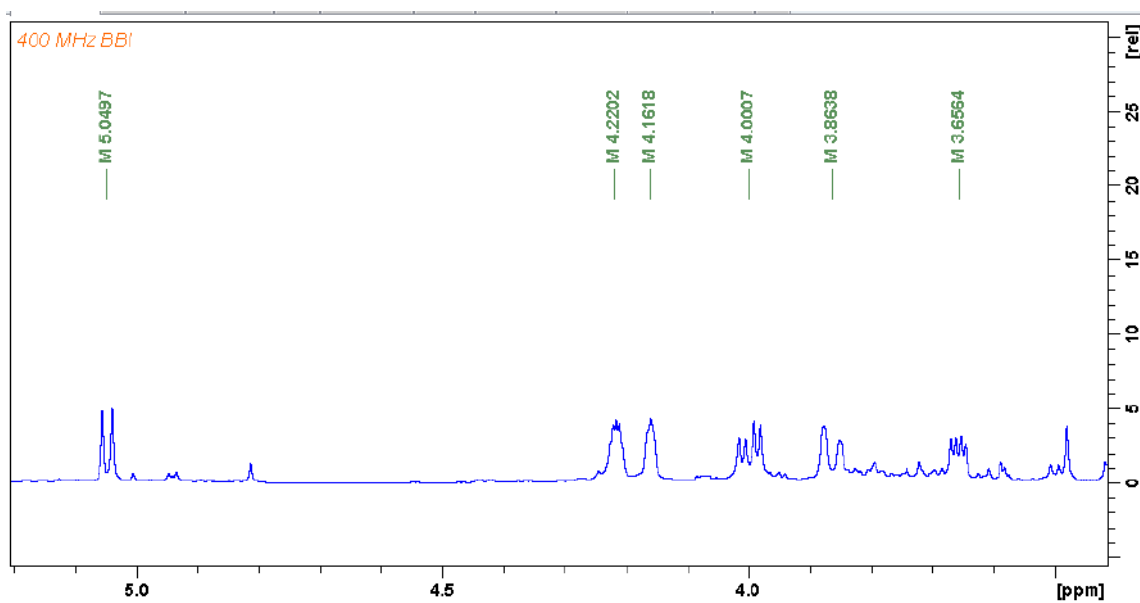


Figura 36: RMN de ^1H do composto **12** (material bruto) (400 MHz, D_2O).

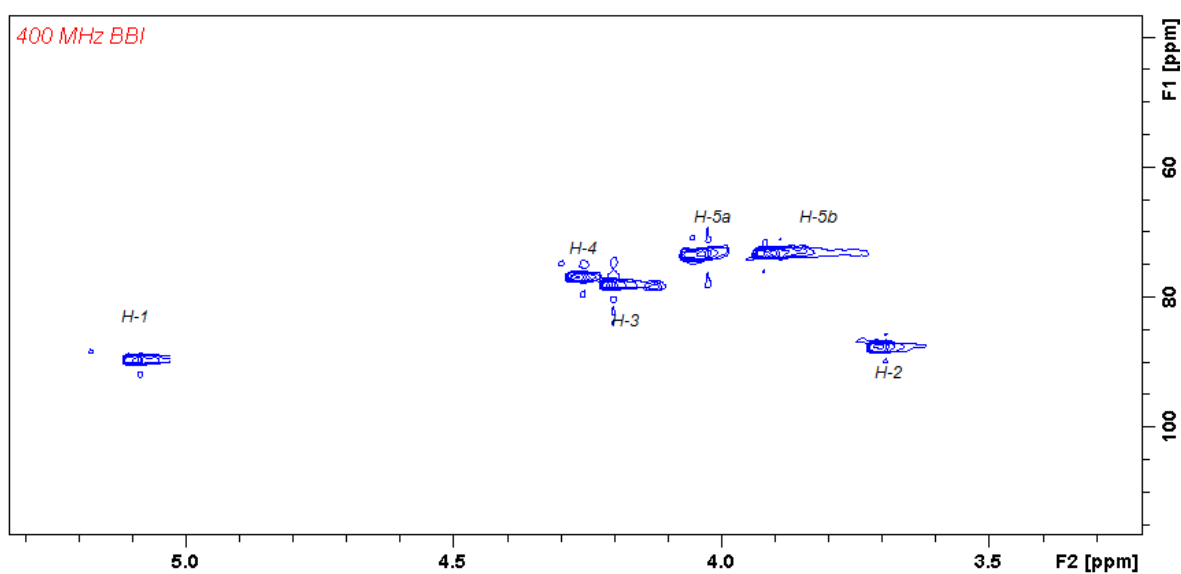
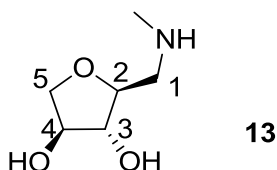


Figura 37: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do composto **12** (material bruto) (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , D_2O).

5.5.8 1-(*N*-Metilamino)-1-desoxi-2,5-anidro-L-lixitol **13** ou (2*S*,3*R*,4*S*)-2-[[*((*metilamino)metil)]tetrahidrofuran-3,4-diol



O material bruto contendo o aldeído hidratado **12** (150 mg, ~1 mmol) foi dissolvido em água (15 mL), onde adicionou-se cloridrato de metilamina (20 equiv.; 1,33 g). A essa solução adicionou-se TEA para ajustar o pH para 11. Após foi adicionado cianoboro-hidreto de sódio (133 mg, 2 equiv.) em única porção e o balão foi fechado imediatamente com septo de borracha. Essa mistura reagiu sob agitação por 5 h em temperatura de refluxo (banho de glicerina, 100 °C). A separação do produto do meio reacional e a purificação foram realizados da mesma maneira que para o composto **3**. Após cromatografia e liofilização foi obtido um sólido branco (32 mg, 22% de rendimento).

$[\alpha]_D$: -12,0 (c 1,0, H₂O). **RMN de ¹H** (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 4,18 (dd, $J = 1,6/3,6$ Hz, 1H, H₄), 3,97 (m, 2H, H_{5a} and H₃), 3,95 (m, $J_{H2-H3} = 3,0$ Hz, 1H, H₂), 3,84 (dd, $J = 1,6/10,1$ Hz, H_{5b}), 3,08 (m, 2H, H_{1a} and H_{1b}), 2,57 (CH₃). **RMN de ¹³C** (100 MHz, D₂O) δ (ppm) 81,7 (C-2), 79,1 (C-3), 76,5 (C-4), 73,2 (C-5), 50,9 (C-1), 33,5 (CH₃). **HRMS**: m/z calculado para $[M+H]^+$ C₆H₁₄NO₃⁺: 148,0974; encontrado: 148,0920.

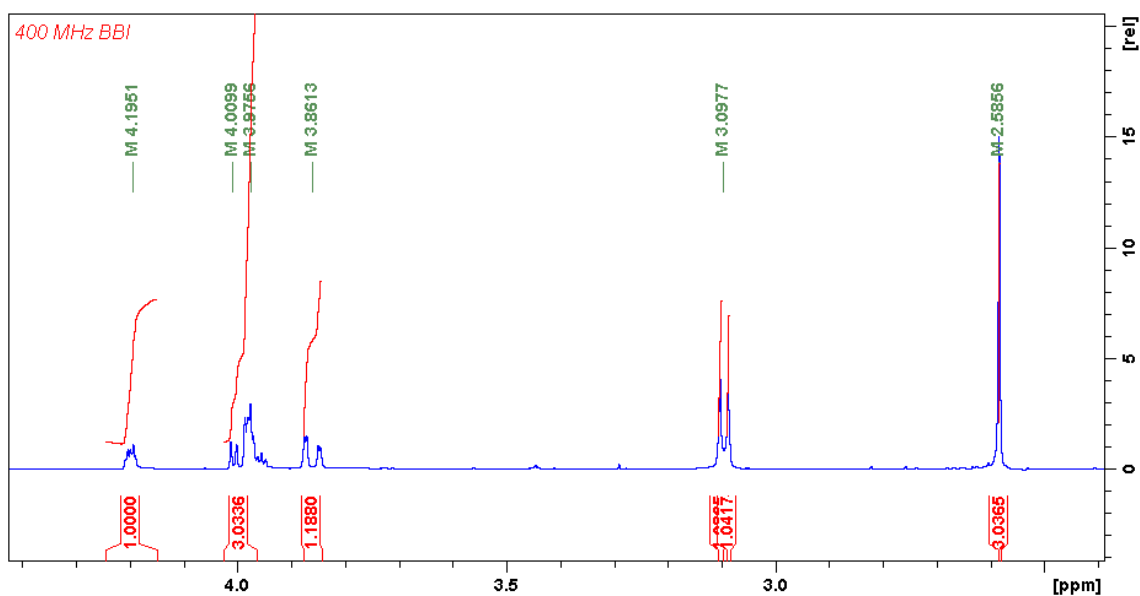


Figura 38: RMN de ^1H do composto **13** (400 MHz, D_2O , pH 4,0).

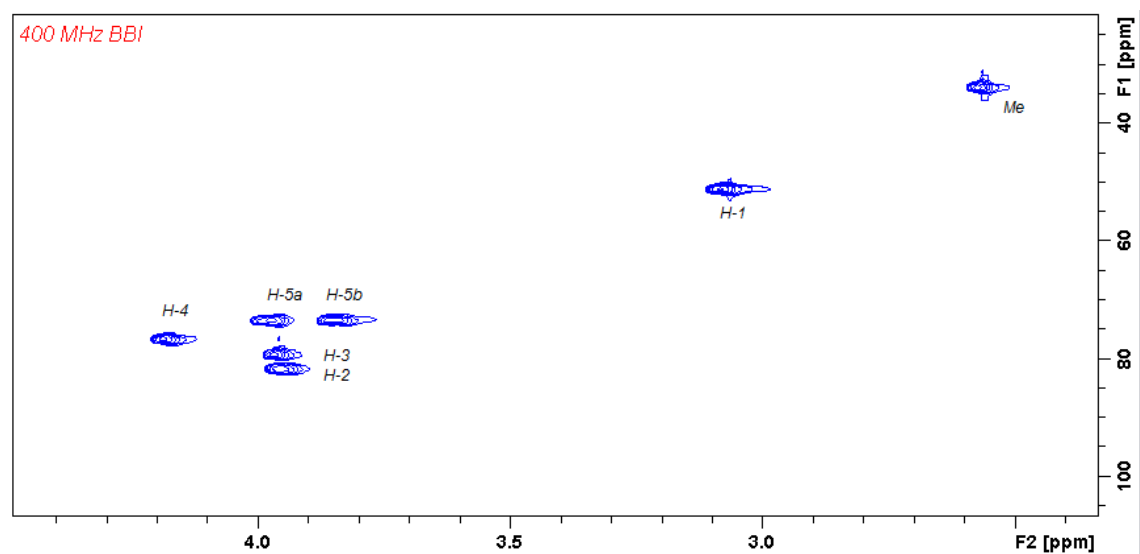
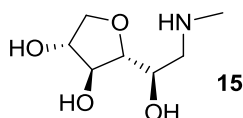


Figura 39: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do composto **13** (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , D_2O , pH 4,0).

5.5.9 1-(*N*-metilamino)-1-desoxi-3,6-anidro- α -D-galactitol **15** ou (2R,3S,4R)-2-[(*R*)-1-hidroxi-2-(metilamino)etil]tetra-hidrofuran-3,4-diol



Kappa-carragenana (2,5 g) foi dissolvida em água destilada quente (200 mL, 90°C). À essa dispersão foi adicionada solução aquosa de TFA 1 mol.L⁻¹ (25 mL), perfazendo uma solução final a 0,1 mol.L⁻¹. A mistura permaneceu sob agitação a 80°C por 3 h. Ao término desse período, foi adicionado 200 mL de água destilada e a mistura foi resfriada até atingir TA. Na sequência esse material foi concentrado em rotaevaporador com pressão reduzida. O resíduo foi então redissolvido com 45 mL de água e adicionou-se 45 mL de álcool isopropílico, gerando um precipitado. Esse material foi filtrado a vácuo em funil com placa porosa nº 2. O filtrado foi seco em rotaevaporador, co-evaporado com metanol e liofilizado, gerando um pó fino amarelado (2,1 g).

O material bruto contendo carrabiose-4-sulfato (2,1 g; ~4,9 mmol) foi dissolvido em água (90 mL), onde adicionou-se cloridrato de metilamina (6,7 g; 20 equiv.). A essa solução adicionou-se TEA para ajustar o pH para 11. Após, foi adicionado cianoboro-hidreto de sódio (625 mg, 2 equiv.) em única porção e o balão foi fechado imediatamente com septo de borracha. Essa mistura permaneceu sob agitação por 5 h em temperatura de refluxo (banho de glicerina, 100°C). O meio reacional foi resfriado até atingir TA e adicionou-se boro-hidreto de sódio (200 mg) para completar a redução do material de partida. Esse material foi filtrado em funil de placa porosa nº 2, e seco em rotaevaporador, resultando num material bruto amarelado (7 g).

Desse material, 700 mg foram dissolvidos em solução aquosa de TFA 2 mol.L⁻¹ (40 mL). Essa solução permaneceu sob agitação a 110°C por 3 h. Esse material foi então diluído com 40 mL de água, resfriado a TA e concentrado em rotaevaporador.

O material foi então redissolvido em 50 mL de água, o pH foi ajustado em 6 com solução aquosa de NaOH 1 mol.L⁻¹, e a mistura foi tratada com resina aniônica (Amberlite IRA 410 - OH⁻ form, 100 mL, 68 g) permanecendo sob agitação por 1 h. A resina foi separada do material por filtração a vácuo e lavada com água (2 x 100 mL). O filtrado foi seco em rotaevaporador e co-evaporado com etanol, resultando um resíduo amarelado. Finalmente, o material foi purificado por cromatografia em coluna de sílica (FM: MeOH/NH₄OH 1 mol.L⁻¹ 6:1), resultando um sólido branco após seco e liofilizado (34% de rendimento em três etapas).

RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 4,27 (m, 1H, H-5), 4,15 (m, 2H, H-2 e H-4), 4,03 (dd, $J = 4,7/10,1$ Hz, 1H, H-6a), 3,87 (dd, $J = 2,9/10,1$ Hz, 1H, H-6b), 3,75 (m, $J_{\text{H3-H4}} = 4,47$ Hz, 1H, H-3), 3,30 – 3,15 (m, 2H, H-1a and H-1b), 2,80 (s, 3H, NCH_3). **RMN de ^{13}C** (100 MHz, D_2O) δ (ppm) 86,0 (C3), 78,7 (C4), 77,5 (C5), 73,5 (C6), 66,7 (C2), 52,1 (C1), 33,5 (CH_3). **LRMS**: m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}]^+$: 178,1079; encontrado: 178,4.

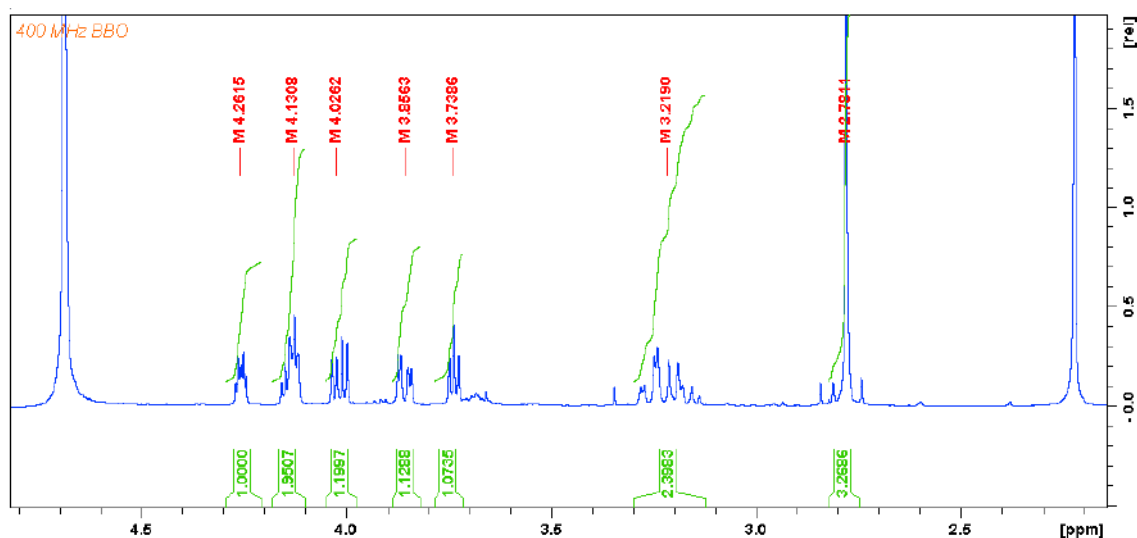


Figura 40: RMN de ^1H do composto **15** (400 MHz, D_2O , pH 4,0).

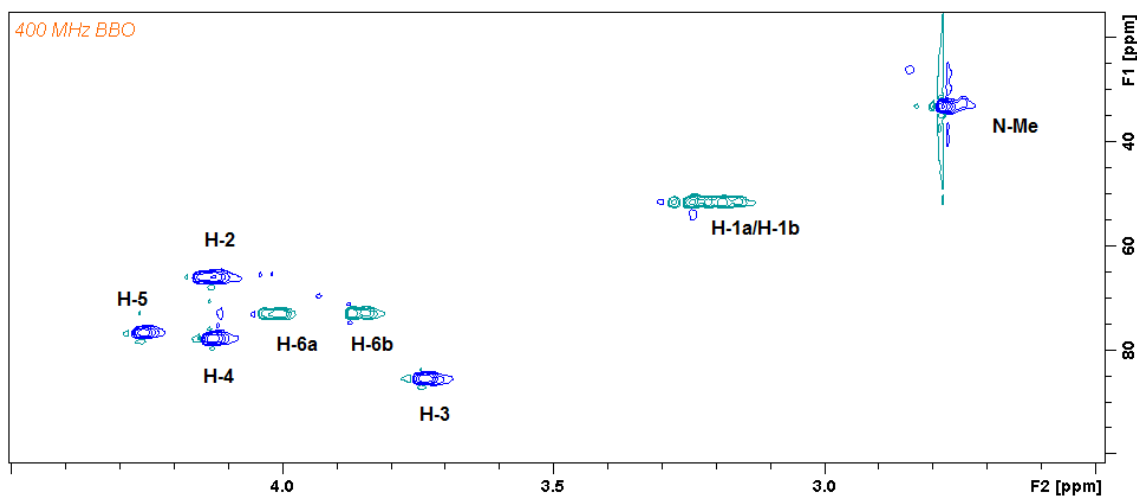
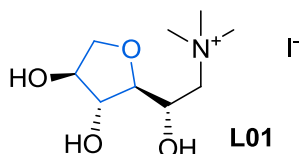


Figura 41: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do composto **15** (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , D_2O , pH 4,0).

5.5.10 1-(*N,N,N*-Trimetilamino)-1-desoxi-3,6-anidro- α -L-galactitol **L01** ou (S)-2-((2S,3R,4S)-3,4-di-hidroxitetra-hidrofuran-2-il)-2-hidroxi-*N,N,N*-trimetiletanamínio



Metilaminoglicamina **9** (80 mg; 0,45 mmol) e carbonato de sódio (40 mg) foram dispersos em 10 mL de metanol e resfriados a 0°C em banho de gelo. A essa mistura foi adicionado iodometano (70 μ L; 1,1 mmol; 1,2 equiv.). A reação permaneceu sob agitação por 18 h, permitindo-se aquecimento até TA. Após, foi adicionado 1 mL de solução aquosa de hidróxido de amônio 1 mol.L⁻¹ e a reação permaneceu sob agitação por mais 30 min. O meio reacional foi então concentrado em rotaevaporador. A purificação foi realizada empregando-se gel de troca iônica CM Sepharose CL-6B. O material foi eluído com solução 0,01 mol.L⁻¹ de cloreto de amônio, resultando em um xarope incolor (83 mg).

RMN de ¹H (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 4,43 (m, 1H, H-2), 4,27 (m, 1H, H-5), 4,13 (dd, J = 2,9/4,5 Hz, 1H, H-4), 4,03 (dd, J = 4,7/10,1 Hz, 1H, H-6a), 3,87 (dd, J = 2,9/10,1 Hz, 1H, H-6b), 3,72 (dd, J = 4,50 Hz, 1H, H-3), 3,58 – 3,50 (m, 2H, H-1a and H-1b), 3,25 (s, 3H, NCH₃). **RMN de ¹³C** (100 MHz, D₂O) δ (ppm) 85,8 (C3), 77,9 (C4), 76,7 (C5), 73,1 (C6), 65,3 (C2), 62,6 (C1), 54,2 (CH₃); **LRMS**: m/z calculado para [M+H]: 206,1387; encontrado: 206,2.

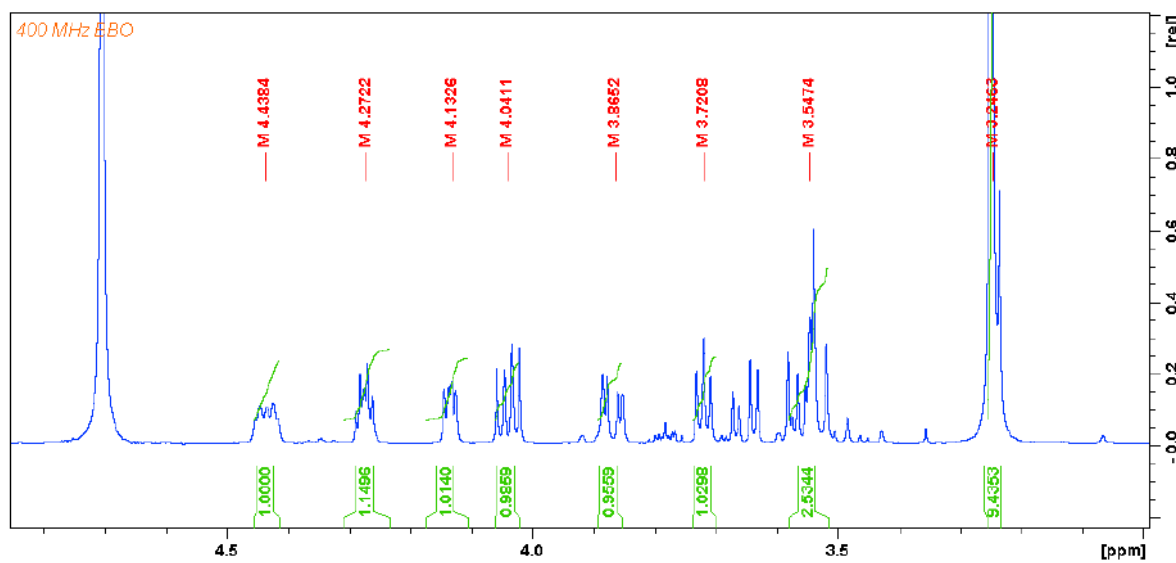


Figura 42: RMN de ^1H do composto **L01** (400 MHz, D_2O , pH 4,0).

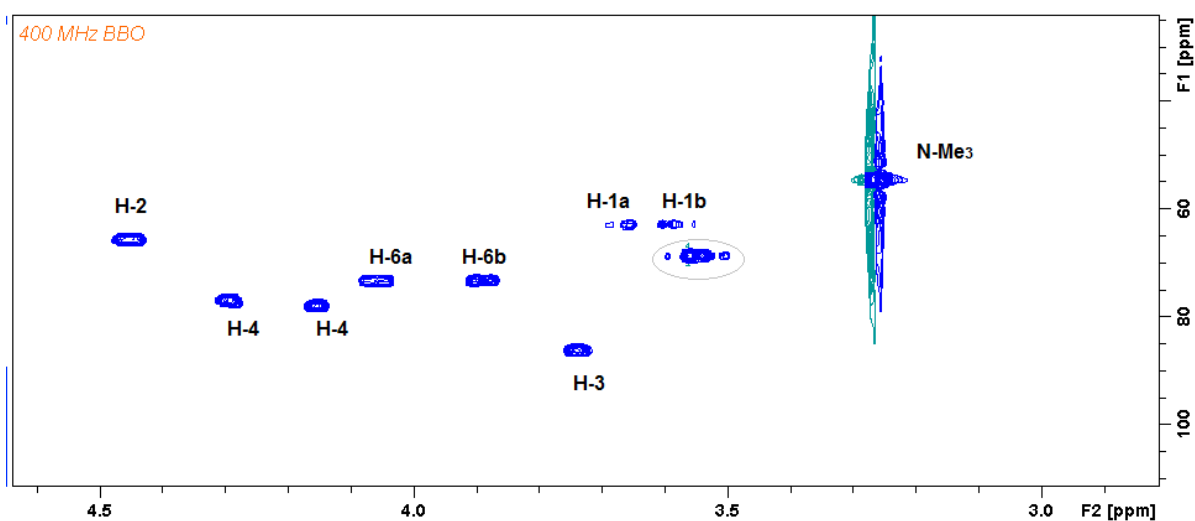
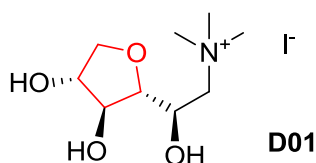


Figura 43: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do composto **L01** (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , D_2O , pH 4,0).

5.5.11 1-(*N,N,N*-Trimetilamino)-1-desoxi-3,6-anidro- α -D-galactitol **D01** ou (R)-2-((2R,3S,4R)-3,4-dihidroxitetrahydrofuran-2-il)-2-hidroxi-*N,N,N*-trimetiletanamínio



Glicamina **15** (80 mg; 0,45 mmol) e carbonato de sódio (40 mg) foram dispersos em 10 mL de metanol e resfriados a 0°C em banho de gelo. A essa mistura foi adicionado iodometano (70 μ L; 1,1 mmol; 1,2 equiv.). A reação permaneceu sob agitação por 18 h, permitindo-se aquecimento até TA. Após, foi adicionado 1 mL de solução aquosa de hidróxido de amônio 1 mol.L⁻¹ e a reação permaneceu sob agitação por mais 30 min. O meio reacional foi então concentrado em rotaevaporador. A purificação foi realizada empregando-se gel de troca iônica CM Sepharose CL-6B. O material foi eluído com solução 0,01 mol.L⁻¹ de cloreto de amônio, resultando em um xarope incolor (78 mg).

RMN de ¹H (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 4,43 (m, 1H, H-2), 4,27 (m, 1H, H-5), 4,13 (dd, J = 2,9/4,5 Hz, 1H, H-4), 4,03 (dd, J = 4,7/10,1 Hz, 1H, H-6a), 3,87 (dd, J = 2,9/10,1 Hz, 1H, H-6b), 3,72 (dd, J = 4,50 Hz, 1H, H-3), 3,58 – 3,50 (m, 2H, H-1a and H-1b), 3,25 (s, 3H, NCH₃).

RMN de ¹³C (100 MHz, D₂O) δ (ppm) 85,8 (C3), 77,9 (C4), 76,7 (C5), 73,1 (C6), 65,3 (C2), 62,6 (C1), 54,2 (CH₃); **LRMS**: m/z calculado para [M+H]⁺: 206,1387; encontrado: 206,2.

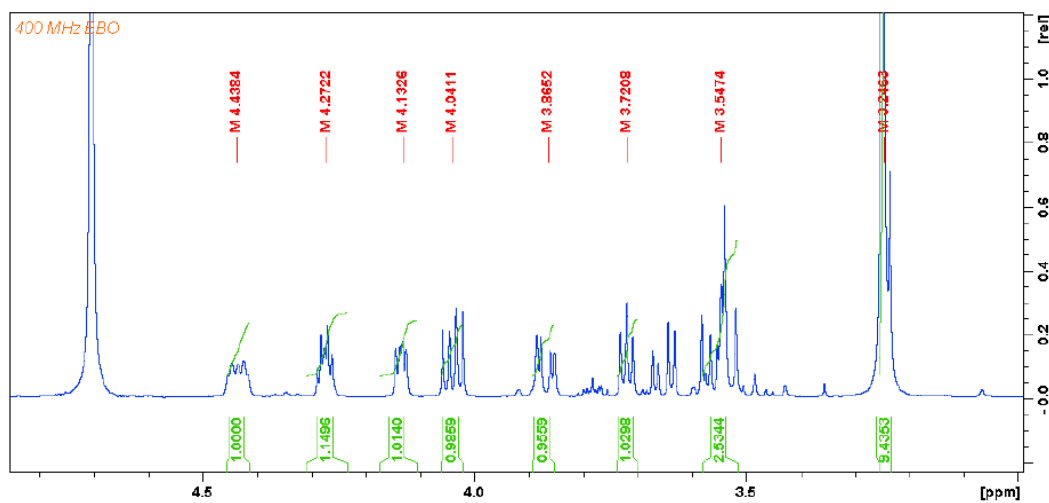


Figura 44: RMN de ^1H do composto **D01** (400 MHz, D_2O , pH 4,0).

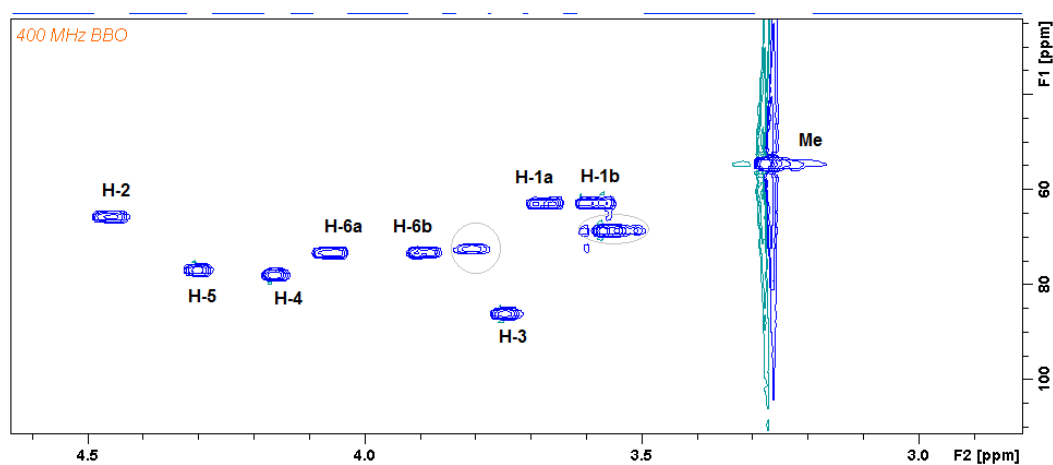
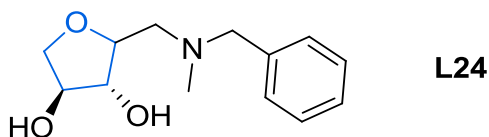


Figura 45: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do composto **D01** (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , D_2O , pH 4,0).

5.5.12 1-(*N*-Benzil-*N*-metilamino)-1-desoxi-2,5-anidro-L-lixitol **L24** ou (3*R*,4*S*)-2-[[*(benzil(metil)amino)metil*]]tetra-hidrofuran-3,4-diol



Metilamino glicamina **13** (55 mg; 0,26 mmol) e carbonato de sódio (82 mg; 0,78 mmol; 3 equiv.) foram dispersos em 10 mL de acetonitrila/metanol 2:1 e resfriados a 0°C em banho de gelo. A essa mistura foi adicionado brometo de benzila (37 µL; 0,31 mmol; 1,2 equiv.) gota-a-gota sob agitação vigorosa. A reação permaneceu sob agitação por 6 h. Após, o meio reacional foi concentrado em rotaevaporador. Esse foi redissolvido em 100 mL de água e extraído com acetato de etila (3 x 100 mL). As frações orgânicas foram secas em rotaevaporador e purificadas por cromatografia em coluna de sílica (eluente: CHCl₃/MeOH 5:1). Após seco e liofilizado o material apresentou aspecto de xarope levemente amarelado (44 mg, 73% de rendimento).

RMN de ¹H (400 MHz, D₂O, pH 4,0) δ (ppm) 7,53 (5H, Ph), 4,41 (2H, CH₂Ph), 4,29/4,22 (1H, H-4), 4,23/4,19 (1H, H-3), 4,09/4,05/3,99/3,78 (2H, H-6a/6b), 4,02 (1H, H-2), 3,49/2,26 (1H, H-1a/1b), 2,91/2,82 (s, 3H, CH₃). **RMN de ¹³C** (100 MHz, D₂O, pH 4,0) δ (ppm) 129-134 (Ph), 80,5 (C2), 80,2 (C3), 77,2 (C4), 74,6 (C5), 62,3 (CH₂Ph), 56,4 (C1), 40,1 (CH₃).

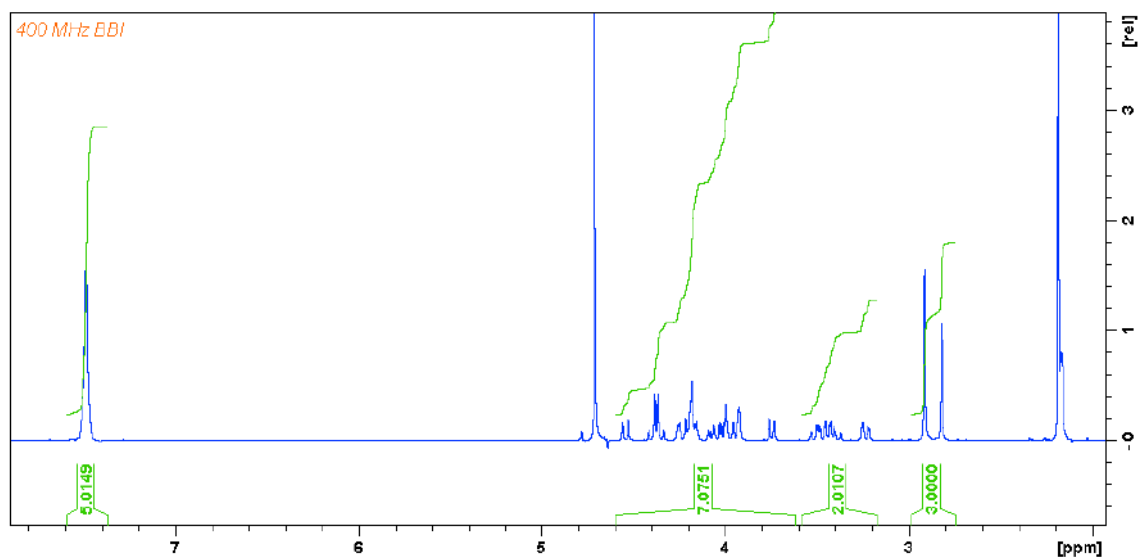


Figura 46: RMN de ^1H do composto **L24** (400 MHz, D_2O , pH 4,0).

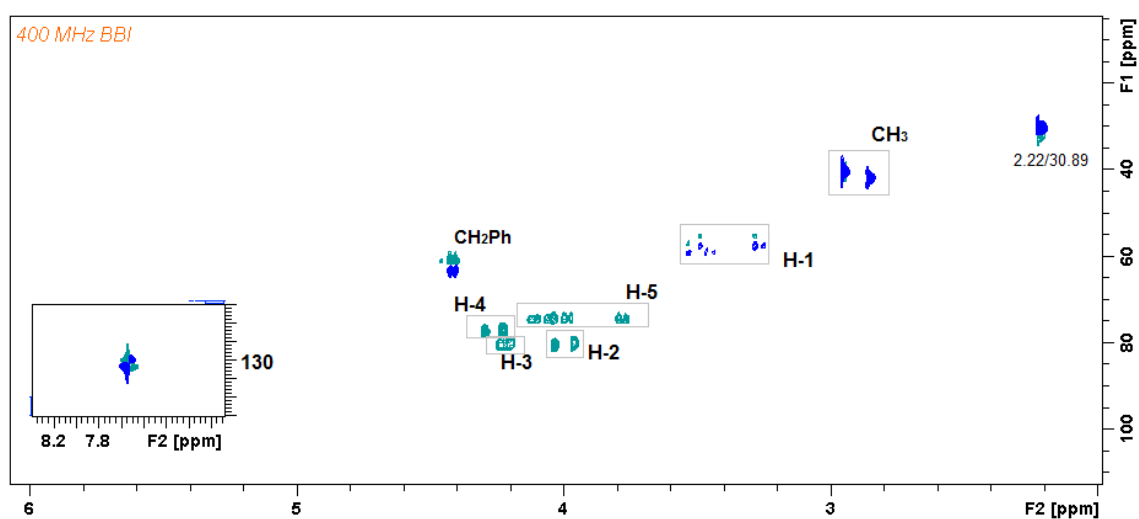
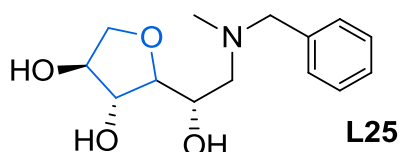


Figura 47: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do composto **L24** (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , D_2O , pH 4,0).

5.5.13 1-(*N*-benzil-*N*-metilamino)-1-desoxi-3,6-anidro- α -L-galactitol **L25** ou (3*R*,4*S*)-2-[(*S*)-2-[benzil(metil)amino]-1-hidroxi-etil]tetra-hidrofuran-3,4-diol



Glicamina **9** (78 mg; 0,26 mmol) e carbonato de sódio (82 mg; 0,78 mmol; 3 equiv.) foram dispersos em 10 mL de acetonitrila/metanol 2:1 e resfriados a 0°C em banho de gelo. A essa mistura foi adicionado brometo de benzila (37 μ L; 0,31 mmol; 1,2 equiv.) gota-a-gota sob agitação vigorosa. A reação permaneceu sob agitação por 6 h. Após, o meio reacional foi concentrado em rotaevaporador. Esse foi redissolvido em 100 mL de água e extraído com acetato de etila (5 x 100 mL). As frações orgânicas foram secas em rotaevaporador e purificadas por cromatografia em coluna de sílica (eluente: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 5:1). Após seco e liofilizado o material apresentou aspecto de xarope levemente amarelado (41 mg, 60% de rendimento).

RMN de ^1H (400 MHz, D_2O , pH 4,0) δ (ppm) 7,53 (5H, Ph), 4,43 (1H, H-2), 4,23 (1H, H-5), 4,22 (2H, CH_2Ph), 4,00 (1H, H-4), 3,98 (1H, H-6a), 3,82 (1H, H-6b), 3,65 (1H, H-3), 3,29 (1H, H-1a), 3,20 (1H, H-1b), 2,91 (s, 3H, CH_3). **RMN de ^{13}C** (100 MHz, D_2O , pH 4,0) δ (ppm) 131,0 (Ph), 84,9 (C3), 78,4 (C4), 77,1 (C5), 73,3 (C6), 65,9 (CH_2Ph), 65,2 (C2), 57,9 (C1), 40,9 (CH_3).

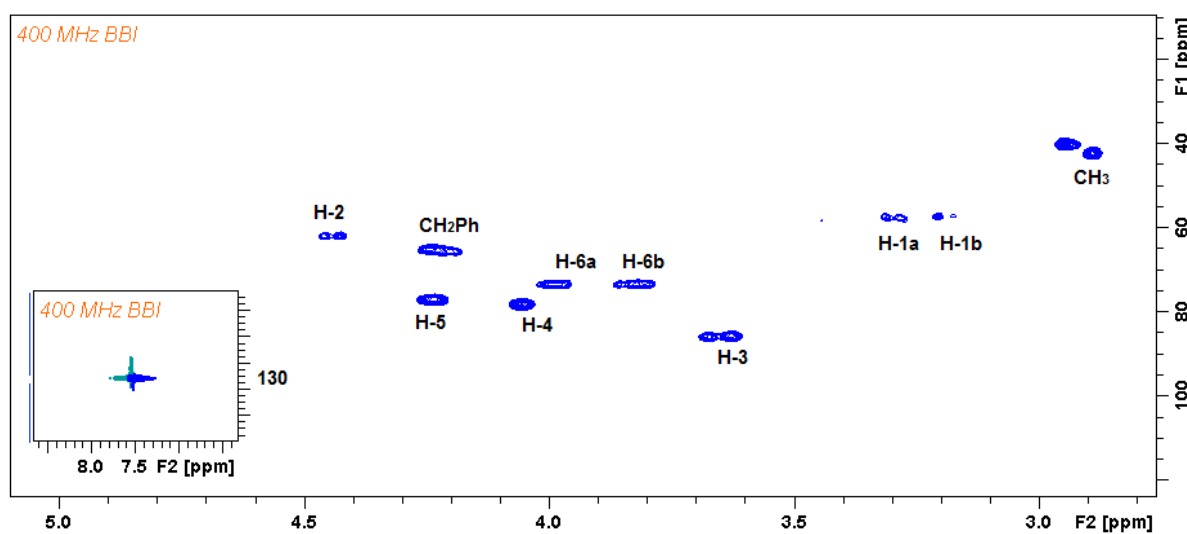
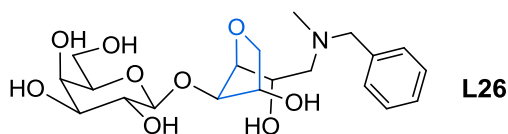


Figura 48: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do composto **L25** (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , D_2O , pH 4,0).

5.5.14 β -D-Galactopiranosil-(1'→4)-1-(*N*-benzil-*N*-metilamino-1-desoxi-3,6-anidro- α -L-galactitol **L26**



Metilaminoglicamina **7** (100 mg; 0,26 mmol) e carbonato de sódio (82 mg; 0,78 mmol; 3 equiv.) foram dispersos em 10 mL de acetonitrila/metanol 2:1 e resfriados a 0°C em banho de gelo. A essa mistura foi adicionado brometo de benzila (37 μ L; 0,31 mmol; 1,2 equiv.) gota-a-gota sob agitação vigorosa. A reação permaneceu sob agitação por 6 h. Após, o meio reacional foi concentrado em rotaevaporador, co-evaporado com etanol e o produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica (eluente: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}_{(30\%)}$ 8:4:1). Após seco e liofilizado o material apresentou aspecto de xarope levemente amarelado (50 mg, 45% de rendimento).

RMN de ^1H (400 MHz, D_2O , pH 4,0) δ (ppm) 7,53 (5H, Ph), 4,57 (1H, H-1'), 4,44 (1H, H-2), 4,41 (1H, H-5), 4,37 (2H, CH_2Ph), 4,28 (1H, H-4), 3,97 (1H, H-6a), 3,97 (1H, H-4'), 3,85 (1H, H-6b), 3,80 (1H, H-3), 3,75 (1H, H-5'), 3,72 (2H, H-6a'-6b'), 3,66 (1H, H-3'), 3,51 (1H, H-2'), 3,31 (2H, H-1a-1b), 2,91 (s, 3H, CH_3). **RMN de ^{13}C** (100 MHz, D_2O , pH 4,0) δ (ppm) 130,7 (Ph), 102,8 ($\text{C}1'$), 85,2 ($\text{C}4$), 84,5 ($\text{C}3$), 75,7 ($\text{C}5'$), 75,7 ($\text{C}5$), 73,7 ($\text{C}6$), 73,0 ($\text{C}3'$), 71,2 ($\text{C}2'$), 69,3 ($\text{C}4'$), 65,2 (CH_2Ph), 61,8 ($\text{C}2$), 61,5 ($\text{C}6'$), 57,6 ($\text{C}1$), 41,1 (CH_3).

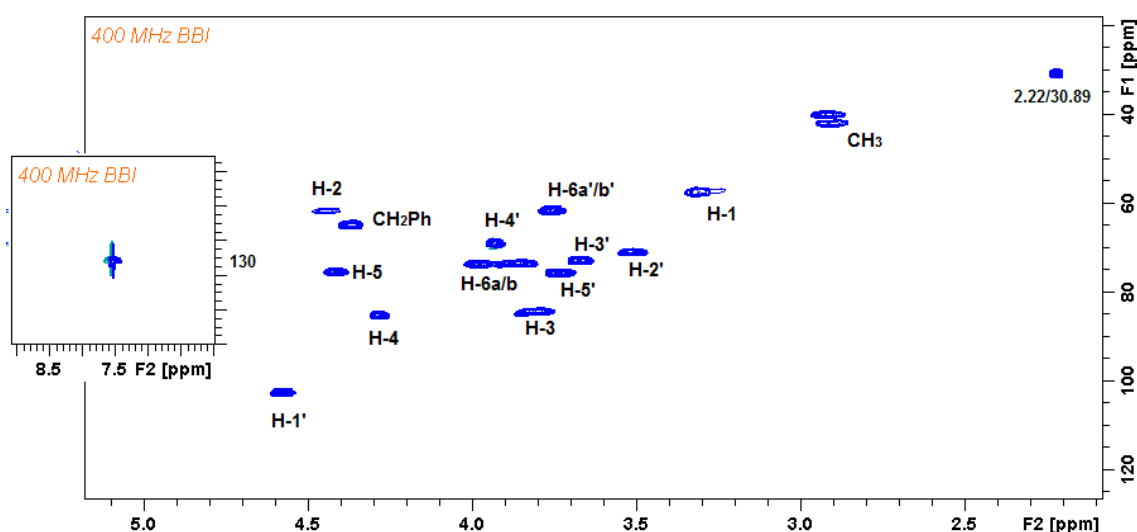
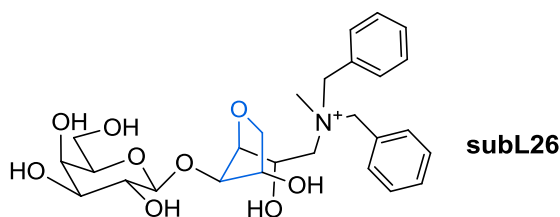


Figura 49: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do composto **L26** (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , D_2O , pH 4,0).

5.5.15 β -D-Galactopiranosil-(1'→4)-1-(*N,N*-dibenzil-*N*-metilamônio)-1-desoxi-3,6-anidro- α -L-galactitol **subL26**



RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, pH 4,0) δ (ppm) 7,64 (4H, o-Ph), 7,47 (6H, m-, p-Ph), 4,84 (1H, H-2), 4,67 (4H, CH_2Ph), 4,30 (1H, H-1'), 4,16 (1H, H-5), 4,13 (1H, H-4), 3,74 (1H, H-6a), 3,65 (1H, H-3), 3,63 (1H, H-6b), 3,61 (1H, H-4'), 3,49 (2H, H6a'-6b'), 3,48 (1H, H-5'), 3,38 (1H, H-1a), 3,30 (1H, H-3'), 3,29 (1H, H-2'), 3,22 (1H, H-1b), 2,97 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C (100 MHz, D_2O , pH 4,0) δ (ppm) 133,3, 128,8 (Ph), 103,3 ($\text{C1}'$), 85,3 (C4), 84,9 (C3), 75,1 ($\text{C5}'$), 74,2 (C5), 73,1 ($\text{C3}'$), 72,6 (C6), 70,4 ($\text{C2}'$), 68,2 ($\text{C4}'$), 65,3 (C2), 64,1 (CH_2Ph), 61,9 (C1), 60,6 ($\text{C6}'$), 47,0 (CH_3).

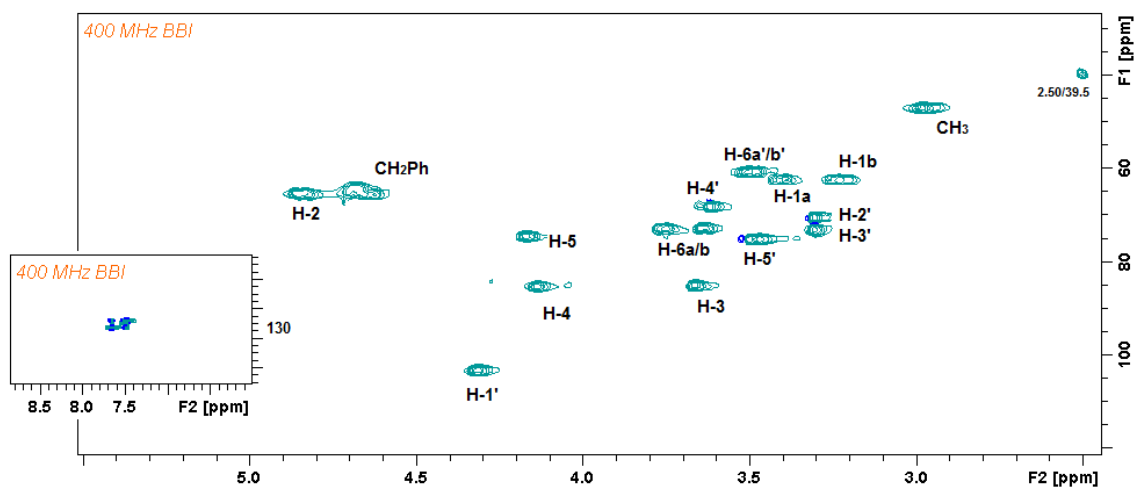


Figura 50: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C do composto **subL26** (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , D_2O , pH 4,0).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO - PARTE II: ARILPIRRÓIS

Os resultados referentes ao planejamento e síntese de derivados arilpirrólicos como moduladores alostéricos dos receptores muscarínicos do subtipo M₁ serão apresentados a seguir na forma de artigo.

Synthesis and Pharmacological Evaluation of Heterocyclic Carboxamides: Positive Allosteric Modulators of the M₁ Muscarinic Acetylcholine Receptor with Weak Agonist Activity and Diverse Modulatory Profiles

Juliana C. C. Dallagnol,^{†,§,¶} Elham Khajehali,^{‡,¶} Emma T. van der Westhuizen,[‡] Manuela Jörg,[†] Celine Valant,[‡] Alan G. Gonçalves,[§] Ben Capuano,[†] Arthur Christopoulos,^{‡,*} Peter J. Scammells^{†,*}

[†] *Medicinal Chemistry, Monash Institute of Pharmaceutical Sciences; Monash University, 381 Royal Parade, Parkville, VIC 3052, Australia*

[‡] *Drug Discovery Biology, Monash Institute of Pharmaceutical Sciences & Department of Pharmacology, Monash University, 381 Royal Parade, Parkville, VIC 3052, Australia*

[§] *Department of Pharmacy, Federal University of Parana, Avenida Prefeito Lothario Meissner 632, Jardim Botânico, Curitiba, Parana, Brazil*

[¶] These authors contributed equally to this manuscript

ABSTRACT: Targeting allosteric sites at M₁ muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) has been considered a promising strategy for the treatment of Alzheimer's disease. Allosteric modulators may not only potentiate binding and/or signaling of the endogenous agonist acetylcholine, but may also possess direct agonist activity (thus referred to as PAM-agonists). Early drug discovery efforts predominantly focused on the development of highly selective and potent M₁ PAMs, with less attention paid to differentiating allosteric agonism from allosteric modulation. Recently published data, however, suggest that PAM-agonists with robust intrinsic efficacy are more likely to produce adverse effects *in vivo* due to the continuous and overactivation of the M₁ receptors. Herein we present the synthesis and pharmacological evaluation of a series of pyrrole-3-carboxamides, inspired by the M₁ PAM-agonist PF-06764427, which has satisfactory efficacy, excellent physicochemical properties but shows cholinergic adverse effects. We explored the versatility of this scaffold proposing structural modifications at three different regions (top, core and pendant) of a prototypical molecule. As a result, the compounds exhibited a diverse range of allosteric profiles. Although, generally, there was a correlation between the degree of agonist activity and the modulatory potency of the PAMs, some derivatives displayed weak intrinsic efficacy yet maintaining strong allosteric modulation. We were also able to identify molecules with the ability to potentiate mainly the affinity or both affinity and efficacy of ACh.

Keywords: Positive allosteric modulators, indole, azaindole, pyrrole, muscarinic acetylcholine receptor, Alzheimer's disease.

■ INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder manifested by the decline of cognitive function including memory, attention and language. The most recent World Alzheimer Report prevalence study estimated that 47 million people worldwide were suffering from AD in 2015 and further projected that without advances in rational drug therapy, the number of symptomatic cases might reach 131 million by 2050 (PRINCE et al., 2015). Dysfunction of cholinergic neurons and deficient acetylcholine (ACh) levels are believed to be the earliest events that trigger the pathology (DAVIS et al., 2010; MEDEIROS et al., 2011; MUFSON et al., 2009). Based on these findings, targeting cholinergic receptors is a promising strategy to slow down the disease progression and ameliorate symptoms (KRUSE et al., 2014). In particular, the M₁ muscarinic acetylcholine receptor (M₁ mAChR) subtype has been linked to the process of cognition, thus considered an attractive therapeutic target (CLADER; WANG, 2005; POTTER, 2010). Consequently, current pharmacotherapy for AD includes acetylcholinesterase inhibitors (i.e. anticholinesterases), which are able to increase the levels of the endogenous orthosteric ligand ACh. Even though these drugs provide some symptomatic relief they are not well tolerated. The indiscriminate activation of all mAChR subtypes (M₁-M₅) leads to significant cholinergic toxicity, typically causing gastrointestinal and cardiovascular adverse effects, which are mainly mediated by activation of the peripheral M₂ and M₃ mAChRs (HOLDEN; KELLY, 2002). For many years researchers had sought to develop M₁ mAChR selective agonists, and despite the numerous efforts in this area, little was achieved (JIANG et al., 2014). The recent high resolution crystal structures of the mAChRs (HAGA et al., 2012; KRUSE et al., 2012; THAL et al., 2016) confirmed that this approach is unlikely to succeed due to the high homology of the orthosteric binding pocket across all five mAChR subtypes.

A new therapeutic opportunity has emerged from targeting the topographically distinct less-conserved allosteric site on M₁ mAChRs which proved to be a fruitful strategy to overcome the lack of receptor subtype selectivity of orthosteric ligands. BQCA (**1**, Figure 1) was the first selective positive allosteric modulator (PAM) of the M₁ mAChR to be described in the literature (MA et al., 2009). Subsequently to its disclosure a vast range of novel chemotypes was disclosed, and insights into the molecular basis of receptor-ligand interactions (ABDUL-RIDHA et al., 2014a, 2014b; KRUSE et al., 2013; THAL et al., 2016; VALANT et al., 2008) as well as enriched structure-activity relationship (SAR) studies (DAVOREN et al., 2016a, 2016b, 2017, MISTRY et al., 2013, 2015, 2016; ROOK et al., 2017) have been published. Allosteric molecules may also possess direct agonist activity in

their own right, and are referred to as ‘allosteric agonists’ if they activate the receptor but do not modulate the orthosteric ligand, or ‘PAM-agonists’ (also ‘ago-PAMs’) if they possess both positive allosteric modulatory properties and agonism. (CHRISTOPOULOS et al., 2014) Although several M₁ PAM-agonists with aligned physicochemical properties and efficacy in rat cognitive function models were developed, recent studies reported evidence of cholinergic toxicity associated with highly selective M₁ PAMs (ALT et al., 2016; DAVOREN et al., 2016b, 2017; ROOK et al., 2017). The authors suggested that overactivation of the M₁ mAChR, as a result of the direct agonist activity of PAM-agonists, could underlie the AEs. It was therefore hypothesized that pure M₁ PAMs would have improved safety profiles.

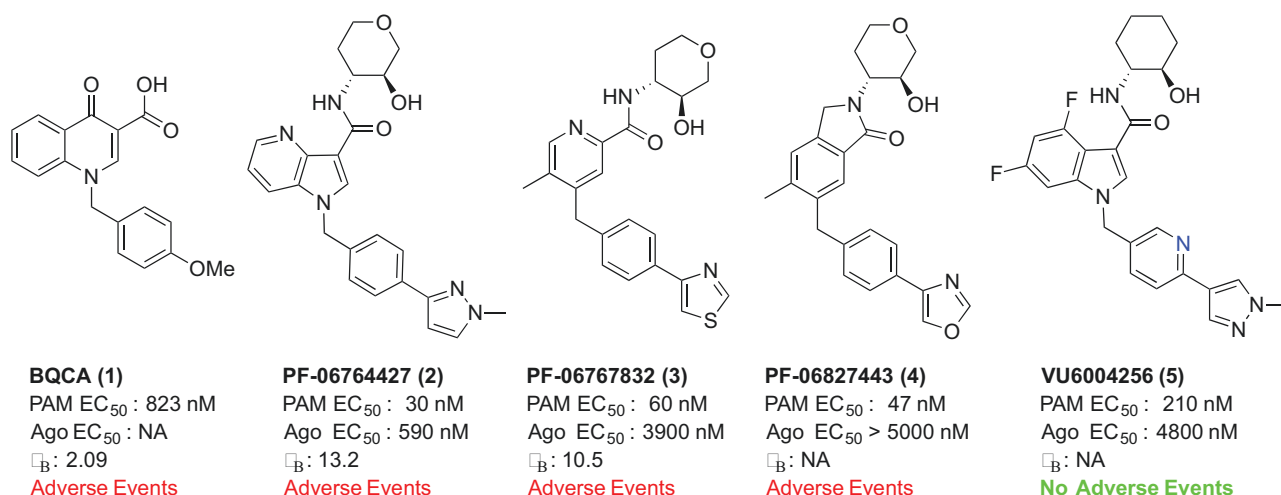


Figure 1. Examples of M₁ mAChR PAM-agonists from Merck **1** (MA et al., 2009), Pfizer **2,3,4** (DAVOREN et al., 2016a, 2016b, 2017) and Vanderbilt **5** (ROOK et al., 2017) with the relevant pharmacological data. PAM EC₅₀ concentrations were obtained using calcium mobilization assays in the presence of a fixed EC₂₀ concentration of ACh (methodologies may differ slightly). Allosteric agonist EC₅₀ concentrations (Ago EC₅₀) were obtained from concentration-response curves for the modulators in the absence of ACh; τ_B values represent a measure of the efficacy of the modulators derived from operational model-fitting, and were estimated in the present work from IP₁ accumulation assays. NA - not available.

Recently, Pfizer published the SAR associated with a series of potent azaindole M₁ mAChR PAM-agonists, with the lead compound being PF-06764427 (**2**) (DAVOREN et al., 2016a). Shortly after, the same group disclosed a pyridine series (lead compound PF-06767832 – **3**), also reporting *in vivo* adverse effects for this class of compounds (DAVOREN et al., 2016b). A subsequent study reported a series of γ- and δ-lactam PAMs (lead compound PF-06827443 – **4**), structurally related to pyridine derivative **3**, which, despite displaying

weak agonist activity, presented adverse effects (DAVOREN et al., 2017). An independent study by the Vanderbilt Center for Neuroscience Drug Discovery, which examined compound **2** together with their own series of indole-3-carboxamides, investigated the adverse effect liability of M₁ mAChR PAM-agonists (ROOK et al., 2017). They have disclosed a unique fluorinated indole, VU6004256 (**5**), as a safe M₁ mAChR PAM-agonist *in vivo*, which is able to potentiate the M₁ mAChR responses to ACh and enhances recognition memory without severe behavioral convulsions and peripheral cholinergic effects, as formerly reported for the Pfizer compounds. Nonetheless, it was not possible to draw a clear correlation between the subtle structural changes of the studied compounds and their pharmacological and safety profiles. It has therefore remained unclear which structural features drive allosteric agonism relative to allosteric modulation or contribute to adverse effect liability.

Herein, we report the development of a pyrrole-3-carboxamide series closely related to compound **2** and detailed pharmacological characterization of selected PAMs in this series. We performed systematic modifications on three different regions (top, core and pendant, Figure 2) of a prototypical molecule **6a** in order to gain molecular diversity. Representative building blocks were selected to be incorporated in each of the regions of the molecule, which included revisiting some of the moieties used in previous studies by Pfizer (DAVOREN et al., 2016a, 2016b, 2017) and Vanderbilt University (ROOK et al., 2017). We have obtained an enriched allosteric SAR profile by dissecting different pharmacological parameters (i.e. binding affinity; K_B , binding and functional cooperativity with ACh; α and $\alpha\beta$, respectively, and direct allosteric agonist efficacy; τ_B) (CANALS et al., 2012; LEACH; SEXTON; CHRISTOPOULOS, 2007), thus providing new insights into the structural basis of allosteric modulation.

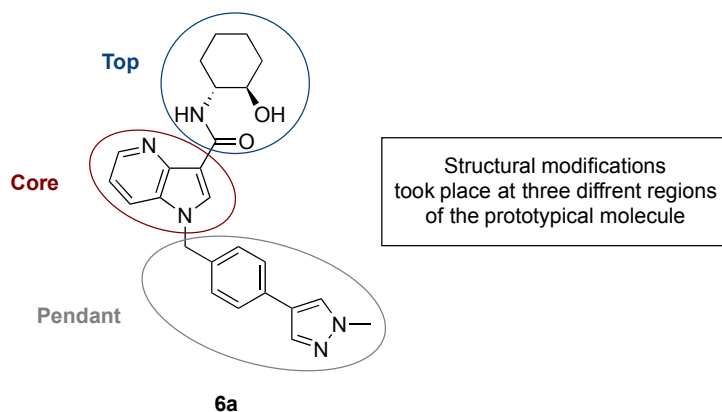


Figure 2. Chemical structure of the representative M_1 mAChR PAM-agonist **6a**, labeling top, core and pendant components of the molecule.

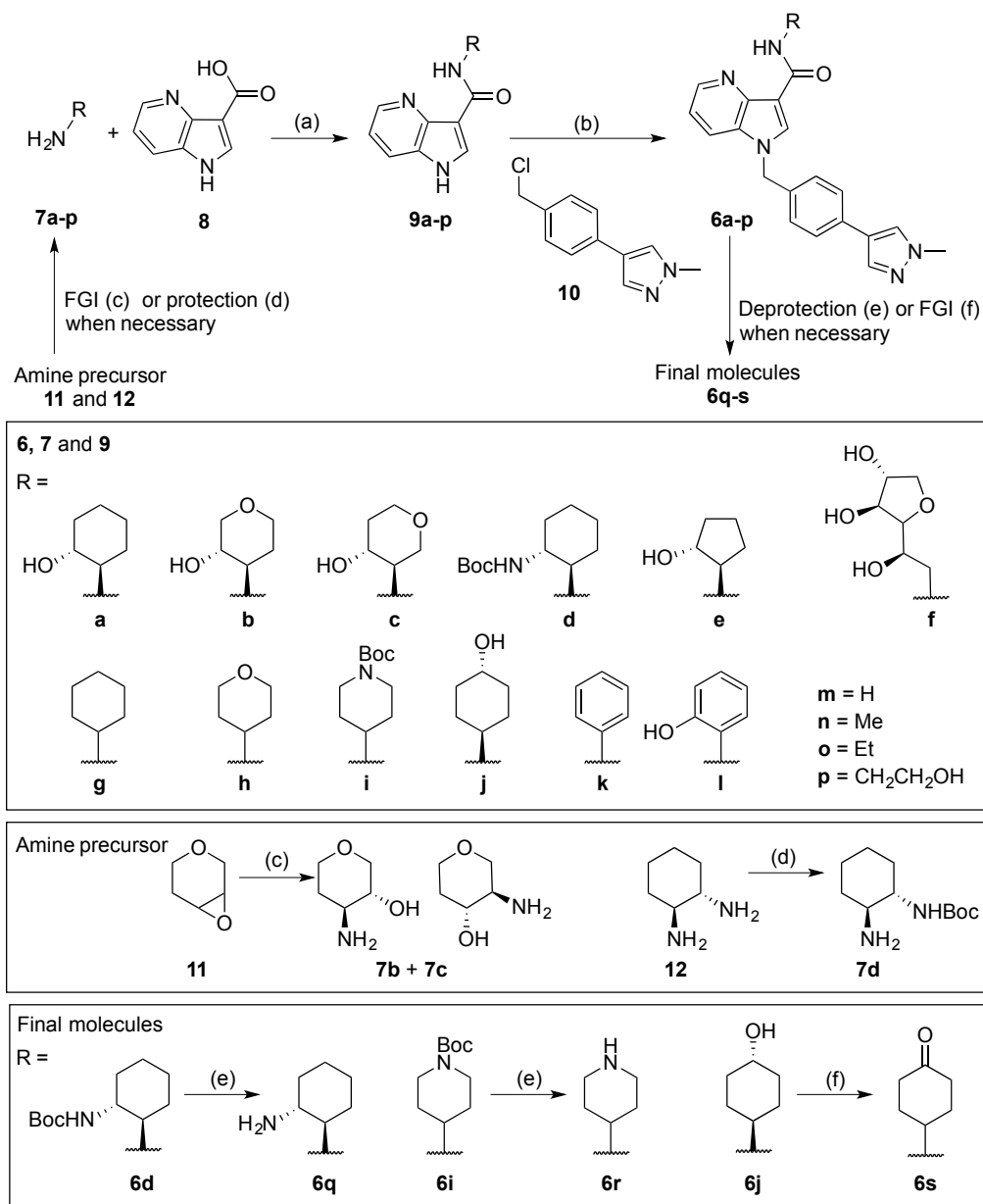
Our optimization efforts were focused towards the development of M_1 mAChR PAMs with distinct pharmacological properties, in particular PAMs with weak agonist activity. The full pharmacological characterization of six selected PAMs in our series and three literature compounds, in binding and functional assays, indicated that there was no correlation between the binding and functional cooperativity with ACh, suggesting that these PAMs could modulate only the affinity or both affinity and efficacy of ACh. However, there was a significant correlation between the intrinsic efficacy of PAMs and their functional cooperativity with ACh, consistent with a two-state model of action (CANALS et al., 2012; CHRISTOPOULOS, 2014).

■ RESULTS AND DISCUSSION

Chemistry. We first synthesized our prototypical compound **6a**, which consists of a hydroxycyclohexyl top, 1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine core and a 4-(1-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl)benzyl pendant. The hydroxycyclohexyl motif was first employed in Merck analogues (KUDUK et al., 2010) and has been present in many M₁ PAMs ever since. It appears to be well tolerated and maintain cooperativity in a range of different scaffolds. The 1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine core (also referred to as 4-azaindole) was maintained in order to preserve the intramolecular hydrogen bond (IMHB) between the fused pyridine nitrogen and the carboxamide hydrogen in some of our analogues. This IMBH was observed in both ¹H NMR and computational torsional energy experiments of **2** and it was considered key to pre-organize the ligand into a putative bioactive conformation thus diminishing interaction-energy requirements to a favorable binding (DAVOREN et al., 2016a). Finally, the 4-(1-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl)benzyl moiety was chosen as it has been used in a range of M₁ mAChR allosteric ligands (including the PAM-agonist **5**), and has shown to contribute to affinity towards the receptor (MISTRY et al., 2013, 2015, 2016). While studying structural modifications in certain regions of the molecule the remaining two other key moieties were kept unaltered allowing a direct comparison with **6a**.

We used a practical two-step synthetic route (Schemes 1-4), thereby taking advantage of two key disconnection points of prototypical compound **6a**, namely the C-N bonds of the carboxamide group and the *N*-alkylated nitrogen of the azaindole core, to obtain a variety of compounds. A collection of 1*H*-indole-3-carboxylic acids and related building blocks were commercially available, thus allowing the installation of a variety of amines on the top part of the molecule via amide coupling. *N*-Alkylation was achieved by nucleophilic substitution by the secondary amine of the core structure with the corresponding benzyl halide pendant. The modifications to the top region included *N*-substituted homo- or heterocyclic alcohols and their amine bioisosteres as well as acyclic and aromatic amides (Scheme 1-2). The core modifications were largely based on bicyclic scaffolds related to indole, halogenated bicyclic analogues and the truncated pyrrole, where the peripheral fused aryl ring was absent (Scheme 3). Finally, for the pendant modifications, we deleted or replaced the *N*-methylpyrazole moiety at the 4-position of the benzyl group by bioisosteric motifs (oxazole, thiazole) or more simple substituents (–OMe, –COOMe, –COOH or –CONH₂) (Scheme 4). These modifications allowed us to explore the structural determinants of the different allosteric features (affinity, cooperativity with ACh and intrinsic efficacy of PAMs).

The synthesis of *N*-substituted carboxamides from a variety of primary amines **7a-p** is shown in Scheme 1. The reaction of *trans*-2-aminocyclohexanol (**7a**) and 4-azaindole-3-carboxylic acid (**8**) using HCTU (2-(6-chloro-1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium hexafluorophosphate) as the coupling agent afforded the amide **9a** in 46% yield. Attempts with different coupling reagents, including HATU (2-(7-aza-1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluoro-phosphate) and EDC•HCl (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride), produced significantly lower yields of the desired product (29% and 15% yield, respectively). Amides **9b-p** were obtained from their parent amines **7b-p** by applying the same methodology used for the synthesis of **9a**, giving yields ranging from 21 to 45%. Some of the amines were prepared from suitable starting materials or Boc-protected prior to incorporation (Scheme 1, bottom). The reaction of 3,7-dioxabicyclo[4.1.0]heptane (**11**) and concentrated ammonium hydroxide aqueous solution resulted in both positional isomers *trans*-aminotetrahydro-2*H*-pyranol **7b** and **7c** in a 1:1 ratio, which were separable by column chromatography yielding 30% of each isomer. Boc-protected amine **7d** was prepared using an excess of *trans*-1,2-diaminocyclohexane **12** to avoid the doubly protected product. The desired amine **7d** was obtained in 15% yield after column chromatography.

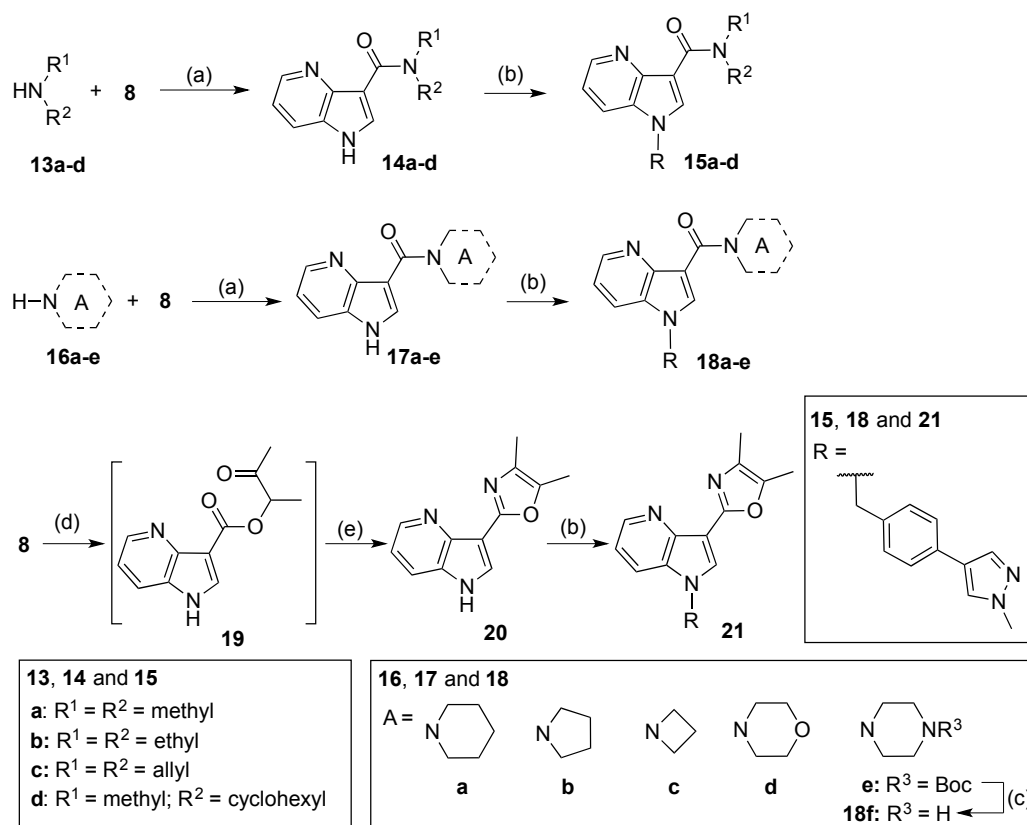
Scheme 1. Synthetic route to obtain a diverse range of top motifs^{a,b}

^aReagents and conditions: (a) HCTU, DIPEA, DMF; (b) **10**, K₂CO₃, DMF; (c) NH₄OH_(aq), MeOH; (d) Boc₂O, DCM/dioxane, 0 °C to rt; (e) TFA, DCM, 0 °C to rt; (f) CrO₃, H₂SO₄, H₂O, acetone, 0 °C to rt. ^bAll reactions were conducted overnight at rt, unless otherwise stated.

The second step was the *N*-alkylation to attach the 4-(1-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl)benzyl moiety to intermediates **9a-p**. The benzyl chloride **10** was prepared in-house (see Scheme 4). We used a convergent synthesis, preparing this moiety prior to the nucleophilic substitution in order to avoid one additional step for the synthesis of each individual analogue. Alternatively, intermediates **9a-p** would have had to be *N*-alkylated with bromobenzyl bromide followed by a Suzuki reaction to introduce the pyrazole moiety. The *N*-alkylations

were performed in DMF using potassium carbonate as base obtaining compounds **6a-p** in good yields from 58-94% (except for compound **6l**). The synthesis of **6l** afforded two byproducts due to *O*-alkylation of the phenolic group. The more complex mixture forced us to adopt a different purification strategy, which included the use of preparative HPLC, resulting in a final yield of 18%. Boc-protection was essential for the synthesis of intermediates **6d** and **6i** to prevent alkylation of the free amino groups. These derivatives were subsequently subjected to Boc-deprotection (Scheme 1, bottom) under acidic conditions to give the final compounds **6q** and **6r** in good yields. Ketone analogue **6s** was obtained in 13% yield by oxidation of the hydroxyl group of derivative **6j** using Jones reagent. The reaction was stopped as soon as byproducts were detected by TLC, even though total consumption of the starting material was not observed at this point.

One of the most promising derivatives of our initial series was the primary amide **6n**. Therefore, we designed structurally related *N,N*-disubstituted amides (Scheme 2). Both acyclic **13a-d** and cyclic **16a-e** amines were installed using the same approach presented before. Intermediates **14a-d** (open carbon chains) were obtained in 17-25% yield and **17a-e** (cyclic analogues) in 30-51% yield. Final compounds **15a-d** and **18a-e** were obtained upon *N*-alkylation of the corresponding amide intermediates (**14**, **17**) with the benzyl chloride pendant **10**. The unprotected piperazine derivative **18f** was afforded after Boc-deprotection of **18e** under acid conditions (Scheme 2). As a bioisostere of **6m**, compound **21** was synthesized by functionalizing the carboxylic acid group in **8** to the corresponding ester in **19** and then undergoing a cyclocondensation to obtain the oxazole top motif in **20**. The next step consisted of the introduction of the pendant to afford **21**. We failed to obtain the mentioned oxazole compound by reacting carboxamide **6m** and 2-chloro-3-butanone following literature methodologies (KADAM; SHAIKH; PATEL, 2016; ZHENG et al., 2014).

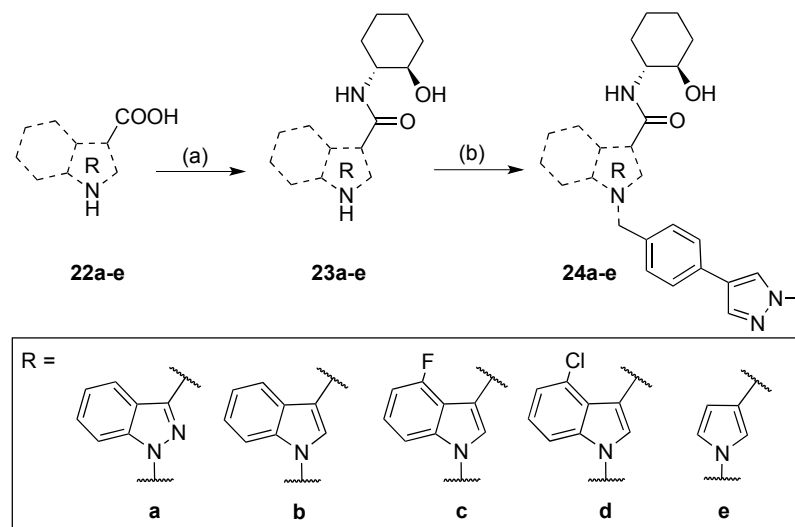
Scheme 2. Synthesis of *N,N*-disubstituted amides and oxazole top motifs^{a,b}

^aReagents and conditions: (a) HCTU, DIPEA, DMF; (b) **10**, K₂CO₃, DMF; (c) TFA, DCM, 0 °C to rt; (d) 2-hydroxy-3-butanone, EDC•HCl, DMAP, DMF; (e) NH₄OAc, AcOH, 120 °C.

^bAll reactions were conducted overnight at rt, unless otherwise stated.

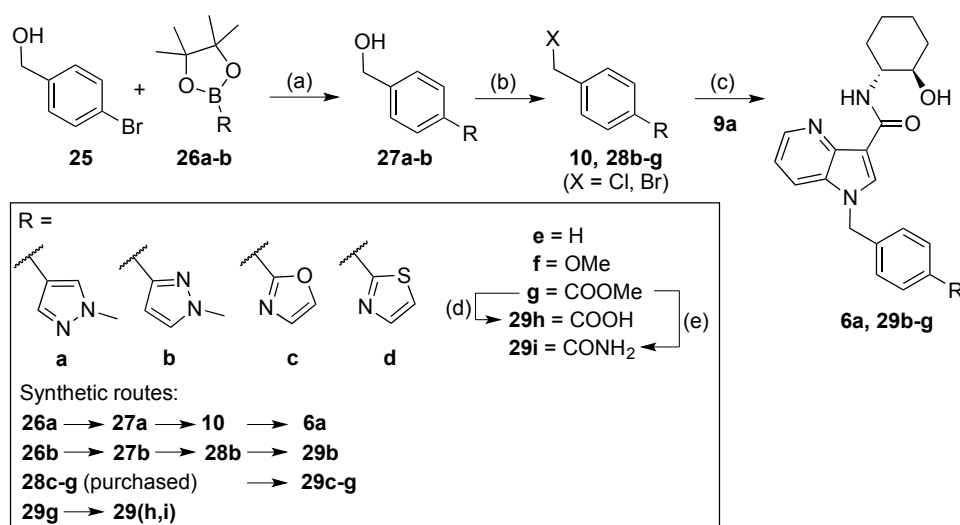
A smaller series of analogues with modifications on the core region of **6a** was achieved by attaching the key moieties (**7a** and **10**) to commercially available heterocyclic carboxylic acids (**22a-e**) (Scheme 3). Amide intermediates **23a-e** were obtained from their corresponding parent carboxylic acids **22a-e** by applying the same amide coupling conditions used in the synthesis of **9a**, in yields ranging from 34-66%. The benzyl pendant **10** was installed as described previously. The electronic withdrawing character of the core moiety had the opposite effect on the yields of the *N*-alkylation since the nucleophile strength depends on the availability of the lone pair of electrons on the aryl-1*H*-pyrrole nitrogen. As a result the lowest yields were observed for **24c** and **24d** (54% and 47%, respectively), while **24b** was synthesized in 82% yield.

Scheme 3. Synthetic route to obtain a diverse range of core motifs^{a,b}



^aReagents and conditions: (a) HCTU, *trans*-2-aminocyclohexanol **7a**, DIPEA, DMF; (b) **10**, K₂CO₃, DMF. ^bAll reactions were conducted overnight at rt.

The final set of compounds shown in Scheme 4 possess different benzyl pendants. Benzyl alcohols **27a** and **27b** were prepared in-house through Suzuki coupling between 4-bromobenzyl alcohol **25** and the corresponding 1-methylpyrazole boronic acid pinacol esters. Next, the alcohol was activated using thionyl chloride to give the corresponding substituted benzyl chlorides **10** (from **27a**) and **28b** (from **27b**). Attempts to produce the benzyl bromide analog of **10** were unsuccessful. All classic methodologies of bromination (using hydrogen bromide, phosphorus tribromide and NBS) failed to yield the expected product or resulted in a complex mixture of products. Benzyl halides **28c-g** were purchased from commercial suppliers rather than prepared in-house. Compounds **29b-g** were obtained after *N*-alkylation of carboxamide **9a** with the respective benzyl halide **28b-g**. Final derivatives **29h** and **29i** were afforded by hydrolysis or aminolysis of the methyl ester **29g**, respectively.

Scheme 4. Synthetic route to obtain compounds with a range of pendant motifs^{a,b}

^aReagents and conditions: (a) PdCl₂(PPh₃)₂, THF/1 M Na₂CO₃, reflux; (b) SOCl₂, DCM, 0 °C to rt; (c) **9a**, K₂CO₃, DMF; (d) EtOH/NaOH_(aq), reflux; (e) MeOH/NH₄OH_(aq), reflux, 3 d. ^bAll reactions were conducted overnight at rt, unless otherwise stated.

Pharmacology. We previously established a rational analysis methodology to describe allosterism and provided enriched SAR of BQCA analogues (MISTRY et al., 2013) as well as exploring different M₁ mAChR PAM chemotypes, 4-phenylpyridinones (MISTRY et al., 2015) and fused arylpyrimidinones (MISTRY et al., 2016). This strategy allowed us to correlate chemical modifications to the changes in parameters that describe allosteric modulation and agonism at the M₁ mAChR. Here, we adopted a similar approach to evaluate the allosteric features of our selected heterocyclic carboxamide derivatives.

Our initial IP₁ accumulation assays provided a robust method to assess the modulation of ACh response by 41 novel putative M₁ mAChR PAMs at 1 μM and 10 μM. The ability of the novel PAMs to modulate the ACh concentration-response curves was determined by calculating the difference in pEC₅₀ (ΔpEC₅₀) as a surrogate for the cooperativity (αβ), and the increase in baseline (Δbaseline) was used as a surrogate for the intrinsic efficacy (τ_B) of the test allosteric ligand. Figure 3 shows the magnitude of the increase in potency of the ACh concentration-response curve and the elevation in the baseline in the presence of 10 μM of the test compound compared to ACh alone (ΔpEC₅₀ vs. Δbaseline). In this manner, we could systematically track the chemical modifications yielding distinct pharmacological properties, such as weak intrinsic efficacy (low Δbaseline) while preserving cooperativity (large ΔpEC₅₀).

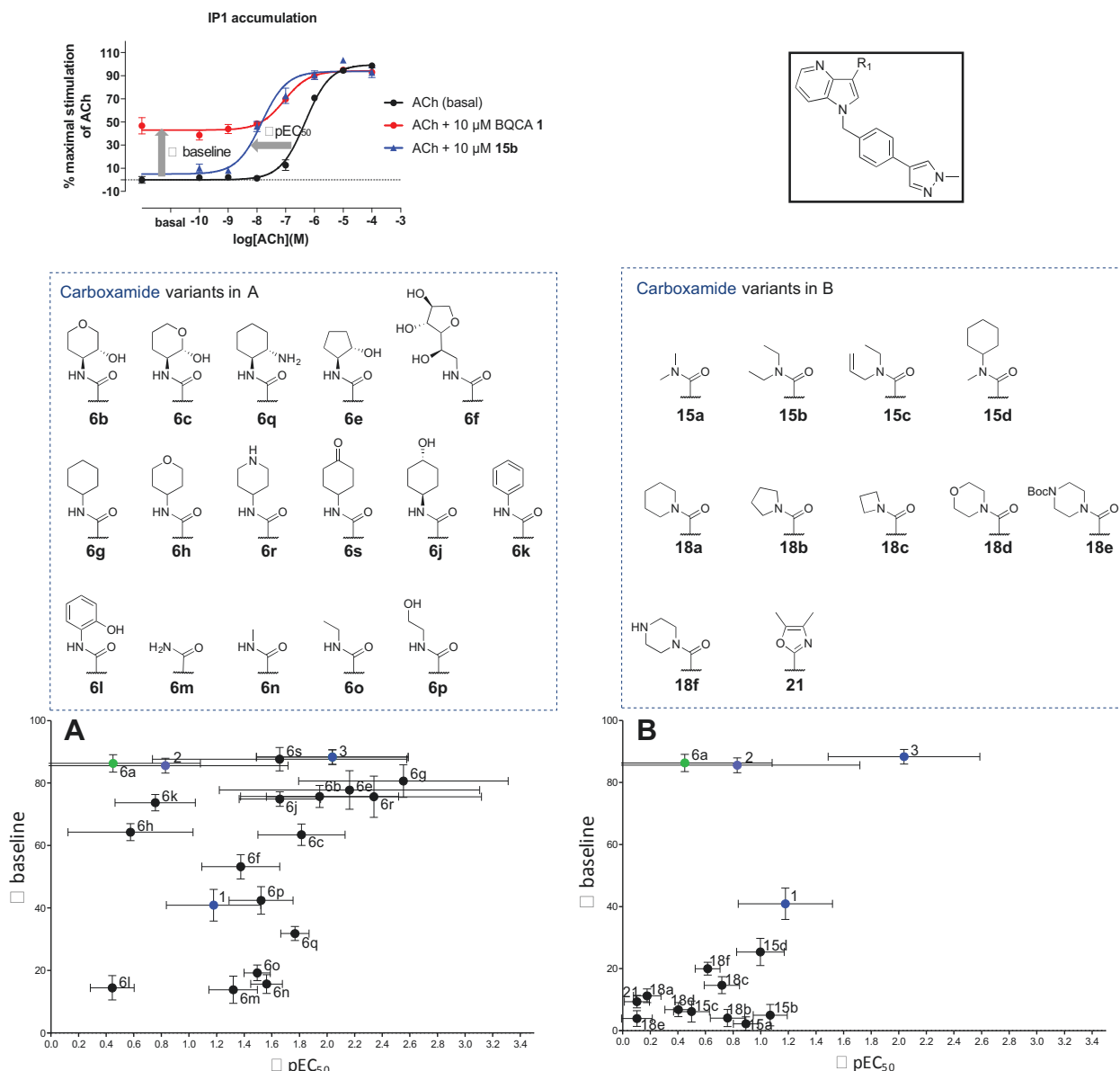


Figure 3. Plot of Δ pEC₅₀ vs Δ baseline. Parameters estimated from concentration-response curves fitted to IP₁ accumulation experiments in M₁ mAChR expressed FlpIN CHO cells. Plotted values represent the means ($n=3$) \pm SEM. Δ pEC₅₀ = pEC₅₀ of (ACh + 10 μ M compound) – pEC₅₀ of ACh (basal). Δ baseline = maximal stimulation of (ACh basal + 10 μ M compound) – maximal stimulation of ACh (basal). Δ pEC₅₀ was used as a surrogate of functional cooperativity for 10 μ M of the modulator and Δ baseline as a surrogate of its direct agonism at the same concentration. In all graphs 1, 2, 3 (in blue) and 6a (green) were included as reference compounds. Graphs: **A.** Plot of *N*-substituted carboxamides **6b-s** – top variants. **B.** Plot of *N,N*-disubstituted carboxamides **15a-d**, **18a-f** and **21** – top variants.

Figure 3A shows the effect of the modifications to the top motif. Compounds **6a** (2-hydroxycyclohexyl), **6b** (2-hydroxytetrahydropyran-3-yl), **6c** (2-hydroxytetrahydropyran-4-yl), **6e** (2-hydroxycyclopentyl), **6f** (1-deoxy-3,6-anhydrogalactitol), **6g** (cyclohexyl), **6h** (tetrahydropyranyl), **6j** (4-hydroxycyclohexyl), **6k** (phenyl), **6r** (piperidiny) and **6s** (4-

oxocyclohexyl) displayed varying degrees of cooperativity with ACh but stronger intrinsic efficacy than BQCA (**1**) when tested at 10 μ M, suggesting that the presence of cyclic substituents at the top of the molecule correlates with strong intrinsic efficacy of the allosteric modulator. Compound **6l** (2-hydroxyphenyl), was an exception to this general phenomenon, displaying low intrinsic efficacy and only weakly potentiating the ACh-mediated IP₁ response. The ¹H NMR spectrum of the compound showed deshielding of the phenolic group, with the –OH signal moving downfield (10.02 ppm), supporting the presence of an additional IMHB. This may impair the activity of **6l** by increasing the energy required to adopt its bioactive conformation upon the receptor-ligand interaction. Deletion of –OH group as in **6k** effectively rescued the intrinsic efficacy of the molecule (Δ baseline **6l** ~14%; **6k** ~73%). Interestingly, whereas compound **6q** (2-aminocyclohexyl top motif) displayed a stronger potentiation of the ACh-mediated IP₁ response, its intrinsic efficacy was significantly lower than that observed for compound **6a** (2-hydroxycyclohexyl), suggesting that positively charged groups in the top part of the molecule may have an important influence on intrinsic efficacy. The primary carboxamide **6m** and acyclic *N*-substituted carboxamide **6n** and **6o** also reduced the intrinsic efficacy of the compounds relative to **1** while maintaining a similar potentiation of the ACh response. However, by the simple addition of a hydroxyl group to the carbon chain, as in **6p**, the intrinsic efficacy of the molecule was returned to that in the range observed with BQCA (**1**).

The presence of H-bond donors (–OH, –NH) and acceptors (O / N) commonly has a substantial impact on the receptor-ligand interactions, possibly creating (or deleting) interactions within amino acids in the binding site (PANIGRAHI; DESIRAJU, 2007). In our series, the deletion of the hydroxyl group in compound **6a** (Δ pEC₅₀: 0.44 \pm 0.63) resulted in a significant increase in the pEC₅₀ (compound **6g** – Δ pEC₅₀: 2.55 \pm 0.75). This top moiety has never been evaluated in previous SAR of indoles or azaindoles M₁ mAChR PAMs (DAVOREN et al., 2016a; ROOK et al., 2017). However, the presence or absence of hydroxyl groups or –O– or HN– heteroatoms on the cyclohexyl top motif did not have a significant impact on the agonist activity of the derivatives (Figure 3A). This represents an opportunity to modify physicochemical properties without losing activity. Polyhydroxylated compound **6f**, for example, is unlikely to cross the BBB (predicted cLogP = 0.177 – while preferred range for brain penetration is cLogP 2-4) (PAJOUHESH; LENZ, 2005). Its activity as M₁ mAChR PAM-agonist could therefore be repurposed to treat peripheral disorders in which the M₁ mAChR is involved (e.g. exocrine glands and gut smooth muscle conditions).

Figure 3B shows that addition of an *N,N*-disubstituted amide to the top part of the molecule, as seen in analogues **15a-d** and **18a-f**, decreased the intrinsic efficacy of the compounds when compared to BQCA **1**. Compounds **15a** (*N,N*-dimethyl), **15b** (*N,N*-diethyl), **15d** (*N*-methyl-*N*-cyclohexyl) and **18b** (pyrrolidine) potentiated the ACh response to a similar extent as seen with BQCA **1** (**1** – ΔpEC_{50} : 1.17 ± 0.34 ; **15a** – pEC_{50} : 0.89 ± 0.09 ; **15b** – ΔpEC_{50} : 1.07 ± 0.12 ; **15d** – ΔpEC_{50} : 1.00 ± 0.17 ; **18b** – ΔpEC_{50} : 0.76 ± 0.12), while having lower intrinsic efficacy. Compound **15d** also had lower intrinsic efficacy than its mono-substituted counterparts, **6a** and **6g**. However, the piperidinyl and *N*-Boc-piperazinyl top motifs (e.g. in **18a**, **18e**) resulted in a complete loss of ACh potentiation. Interestingly, the piperazine top motif, as in compound **18f**, increased the intrinsic efficacy relative to the bioisostere **18d** (morpholine), while the bioisostere **18a** (piperidine) remained essentially inactive. The more rigid incorporation of a dimethyloxazole (compound **21**) was not well tolerated and completely obliterated the intrinsic efficacy and cooperativity with ACh. Overall, the *N,N*-disubstituted compounds (**15** and **18**) proved that the removal of the capacity to form an intramolecular H-bond by replacing the amide hydrogen with an alkyl chain, is not significantly detrimental to the modulation of ACh response and that this modification may contribute to the diminished intrinsic efficacy of these PAMs. However, compounds **6m-o** which have the IMHB intact, also showed reduced intrinsic efficacy compared to **1**, and retained strong cooperativity with ACh.

In Figure 4, the effects of modifications to the core part of the molecule and the benzyl pendant were explored. Compound **6a** and other bicyclic scaffolds, **24a-d**, showed essentially a PAM-agonist profile, and were all more potent allosteric agonists than **1**. However, in contrast to a 45-fold decrease in EC_{50} by replacing azaindole (as in **6a**) with the indazole core (as in **24a**) reported by DAVOREN et al. (2016a) we did not observe a significant difference in ΔpEC_{50} values for these two compounds.

Creating a new scaffold by simplification of the azaindole core, as shown in compound **24e**, caused a dramatic drop in intrinsic efficacy, while still maintaining cooperativity with ACh (7-fold potentiation of ACh activity). Similar to the *N,N*-disubstituted carboxamide series, the absence of a IMHB did not result in a critical decrease in the modulatory effect.

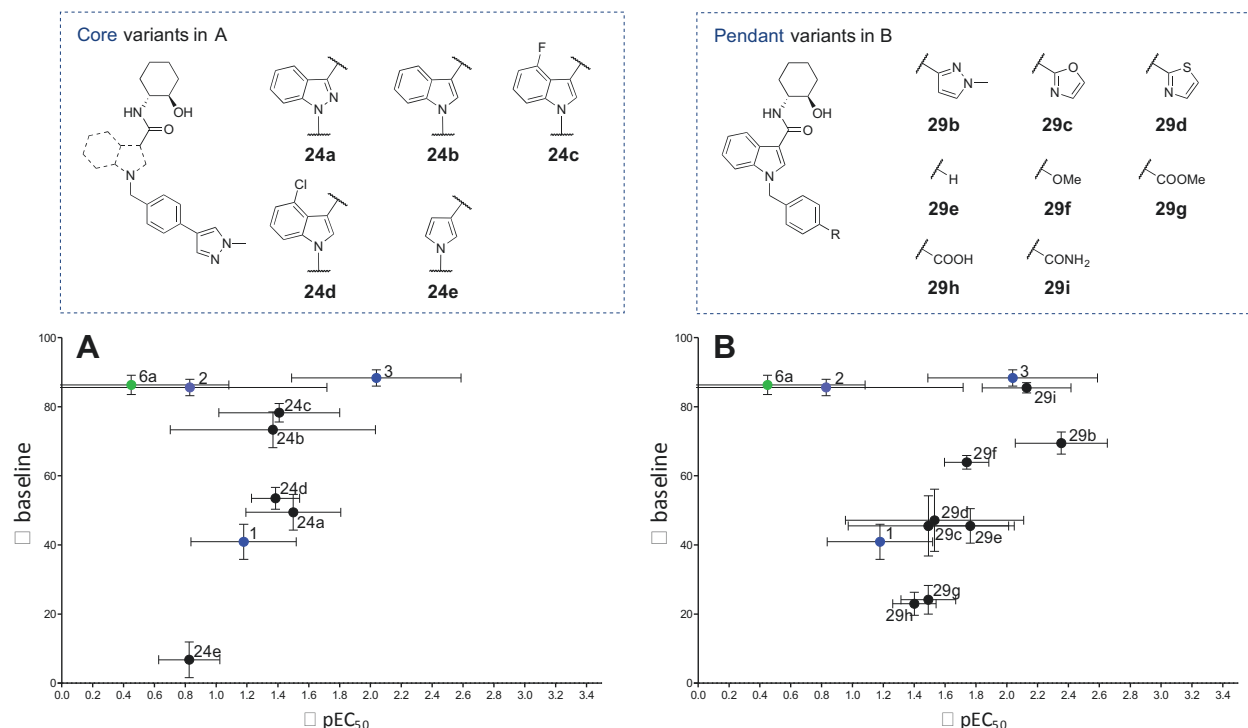


Figure 4. Plot of ΔpEC_{50} vs $\Delta baseline$. Parameters estimated from concentration-response curves fitted to IP₁ accumulation experiments in M₁ mAChR expressed FlpIN CHO cells. Plotted values represent the means ($n=3$) \pm SEM. ΔpEC_{50} = pEC_{50} of (ACh + 10 μ M compound) – pEC_{50} of ACh (basal). $\Delta baseline$ = maximal stimulation of (ACh basal + 10 μ M compound) – maximal stimulation of ACh (basal). ΔpEC_{50} was used as a surrogate of functional cooperativity for 10 μ M of the modulator and $\Delta baseline$ as a surrogate of its direct agonism at the same concentration. In all graphs **1**, **2**, **3** (in blue) and **6a** (green) were included as reference compounds. Graphs: **A**. Plot of compounds **24a-e** – core variants. **B**. Plot of compounds **29b-i** – pendant variants.

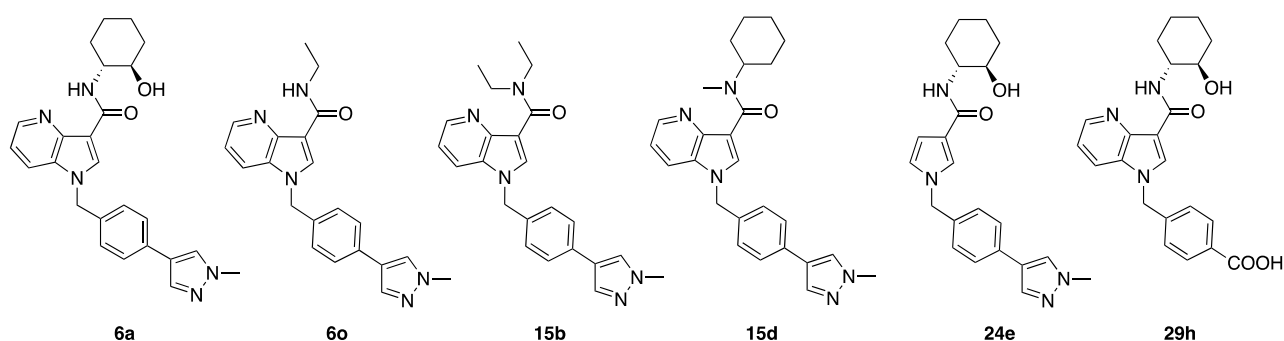
Figure 4B shows the effects of alterations to the pendant moiety on the intrinsic efficacy and cooperativity of the novel PAMs. The positional isomers 4- and 3-*N*-methylpyrazole motif, as in compounds **6a** and **29b**, had significantly different cooperativity values (ΔpEC_{50} : 0.45 ± 0.63 and 2.35 ± 0.30 , respectively), consistent with previously published data by Rook and colleagues.²⁴ By replacing the methylpyrazole motif in **6a** with an –OMe group (**29f**), the cooperativity with ACh was decreased while the strong intrinsic efficacy was maintained, in agreement with previously published results by Davoren and colleagues.²² Changing the pendant group to an oxazole (compound **29c**), thiazole (**29d**) or hydrogen (**29e**) had minimal overall effects on the cooperativity or intrinsic efficacy of these compounds when compared to **1**. However, changing the pendant group to a –CONH₂ group (**29i**) afforded a significant increase in intrinsic efficacy and improved cooperativity with ACh, consistent with our previous findings on other scaffolds (MISTRY et al., 2013, 2015, 2016). In contrast, its

bioisosteres **29h** (-COOH) and **29g** (-COOMe) had similar cooperativity but lower intrinsic efficacy compared to **1**.

Overall, in search of compounds with improved cooperativity with ACh and reduced intrinsic efficacy compared to the prototypical allosteric modulator BQCA **1**, compounds **6o**, **15b**, **15d** (top part modified), **24e** (core modified) and **29h** (pendant modified); as well as **6a** and the literature compounds **2** and **3** (for comparison); were selected for further pharmacological characterisation.

To determine the affinity and binding cooperativity of the allosteric modulators with the radiolabeled antagonist, [^3H]NMS, at the M_1 mAChR, whole cell equilibrium binding studies were performed. Increasing concentrations of the endogenous agonist, ACh, competed for [^3H]NMS binding to the M_1 mAChR ($\text{pK}_i = 5.41 \pm 0.08$). Compounds **1**, **2**, **3** and **6a** also almost completely inhibited [^3H]NMS binding (i.e. via high negative cooperativity), and their binding affinity (pK_B) values could therefore be estimated from these experiments (Table 1 and Supporting Information Figure 1A). All the other PAMs tested had no or weak effects in their own right. To determine the binding cooperativities ($\text{Log}\alpha$) between ACh and PAMs, increasing concentrations of the modulators were titrated against an EC_{20} concentration of ACh (3 μM) (Supporting Information, Figure 1B), and the data were analyzed using an allosteric ternary complex model (Eq. 1, Experimental section) (MAY et al., 2007b). The binding affinities for **6o**, **15b**, **15d**, **24e** and **29h** were also obtained from these analyses (Table 1).

Table 1. Binding and functional allosteric parameters for selected carboxamides and literature compounds at the M₁ mAChR.



| | radioligand binding ([³ H]NMS) | | | IP ₁ accumulation | |
|------------|--|-----------------------------|--|--|--|
| | p <i>K</i> _B | Log <i>α</i> ' ^c | Log <i>α</i> (<i>α</i>) ^d | Log <i>αβ</i> (<i>αβ</i>) ^e | Log <i>τ</i> _B (<i>τ</i> _B) ^f |
| 1 | 5.48 ± 0.09 ^a | -0.91 ± 0.12 | 1.58 ± 0.09 (38.0) | 1.44 ± 0.10 (27.5) | 0.32 ± 0.05 (2.09) |
| 2 | 6.41 ± 0.05 ^{*a} | -1.28 ± 0.05 | 1.52 ± 0.08 (33.1) | 1.94 ± 0.10 (87.1)* | 1.12 ± 0.03 (13.2)* |
| 3 | 6.20 ± 0.04 ^{*a} | -1.32 ± 0.12 | 1.71 ± 0.08 (51.3) | 1.97 ± 0.08 (93.3)* | 1.02 ± 0.03 (10.5)* |
| 6a | 5.92 ± 0.09 ^{*a} | -1.35 ± 0.28 | 1.66 ± 0.07 (45.7) | 2.66 ± 0.07 (457)*† | 1.36 ± 0.03 (22.9)* |
| 6o | 4.61 ± 0.02 ^{*b} | ND | 1.55 ± 0.09 (35.5) | 2.19 ± 0.05 (155)*† | 0.56 ± 0.04 (3.63) |
| 15b | 4.43 ± 0.09 ^{*b} | -0.11 ± 0.04 | 1.28 ± 0.06 (19.0) | 1.34 ± 0.08 (21.9) | 0 |
| 15d | 4.91 ± 0.09 ^{*b} | ND | 1.23 ± 0.07 (17.0)* | 1.73 ± 0.07 (53.7)† | -0.24 ± 0.11 (0.57)* |
| 24e | 4.19 ± 0.06 ^{*b} | -0.05 ± 0.01 | 1.81 ± 0.08 (64.6) | 2.06 ± 0.11 (115)* | 0.52 ± 0.09 (3.31) |
| 29h | 4.63 ± 0.20 ^{*b} | -0.26 ± 0.15 | 1.76 ± 0.12 (57.5) | 1.97 ± 0.06 (93.3)* | 0.46 ± 0.04 (2.88) |

^aValues were estimated from one way competition with [³H]NMS. ^bValues were estimated from competition with [³H]NMS in the presence of an EC₂₀ concentration of ACh. For compound **1**, **2**, **3** and **6a**, the Log*α*' with [³H]NMS was fixed to the value obtained in (a), for all other ligands was fixed to 0. ^cBinding cooperativity with [³H]NMS. ^dBinding cooperativity with ACh. ^eFunctional cooperativity with ACh. For compound **1**, **2**, **3** and **6a**, p*K*_B was fixed to the value obtained in a, for all other PAMs was fixed to the value obtained in b. ^fIntrinsic efficacy of the modulator. *Significant difference (p < 0.05) was determined using one-way ANOVA with Dunnett's post test compared to **1** as the reference PAM. †Significant difference (p < 0.05) between Log*α* and Log*αβ* values for each compound was determined using unpaired t-test. Data represent the mean ± SEM of at least four individual experiments in duplicate.

As shown in Table 1, the binding affinities were improved for **2**, **3** and our prototypical PAM, **6a** (2-hydroxycyclohexyl top motif) compared to BQCA **1**. However, modifications to the core, top and pendant of **6a** reduced affinities of PAMs at the M₁ mAChR. Davoren and coworkers (DAVOREN et al., 2016a) have proposed that the π - π interactions between the azaindole core and Trp400 and Tyr179 residues are important to the overall potency of this class of compounds. Similarly, interaction between the heterocycle at the 4-position of the

benzyl pendant is supposed to be key for electrostatic and π interactions within a tyrosine and glutamic acid rich pocket. However, no information about the relevance of the hydroxycyclohexyl top moiety interactions within the allosteric pocket is available in the literature. Interestingly, all PAMs tested in our work, except for **15d**, displayed similar binding cooperativities with ACh, as seen by BQCA **1**, although having lower affinities.

To investigate the effects of selected PAMs on receptor function, concentration-response curves for ACh-stimulated IP₁ accumulation were generated in the absence or presence of increasing concentrations of the test compounds (Supporting Information Figure 2). An operational model of allosterism and agonism was applied to estimate their intrinsic efficacy (τ_B) and functional cooperativity with ACh ($\alpha\beta$). The binding affinities were fixed to the values obtained in the binding studies, shown in Table 1. Consistent with previously published data (DAVOREN et al., 2016b; ROOK et al., 2017), we observed approximately 5-fold increase in intrinsic efficacy of **2** and **3** compared to **1** (Table 1). However, in contrast to previous studies (DAVOREN et al., 2016a, 2017), where **3** displayed lower agonism than **2** (Ago EC₅₀ = 590 nM for **2** and 3900 nM for **3**, Figure 1), we obtained similar τ_B values for these compounds. In our series, the two *N,N*-disubstituted carboxamides (**15b** and **15d**) displayed the weakest intrinsic efficacy, whereas the agonist activity of only **6a** was increased compared to **1**.

Interestingly, unlike the binding cooperativities, the functional cooperativities of all the PAMs tested, except for **15b** and **15d**, were significantly increased compared to **1** (Table 1). The Log $\alpha\beta$ values for compounds **6a**, **6o** and **15d** were significantly higher than the Log α values, whereas for all other PAMs tested there were no significant differences between Log α and Log $\alpha\beta$ values. This suggests that the modulation of ACh signaling derives from different phenomenons with the different compounds (modulation of the binding and/or the functional cooperativity). Overall, there was no significant correlation between the Log α and Log $\alpha\beta$ values (Figure 5A), indicating that the differences are not solely due to the different experimental conditions in binding and IP₁ accumulation assays. Compounds **6a**, **6o** and **15d** may therefore modulate both the affinity and efficacy of ACh whereas compounds **1**, **2**, **3**, **15b**, **24e** and **29h** may act as only affinity modulators.

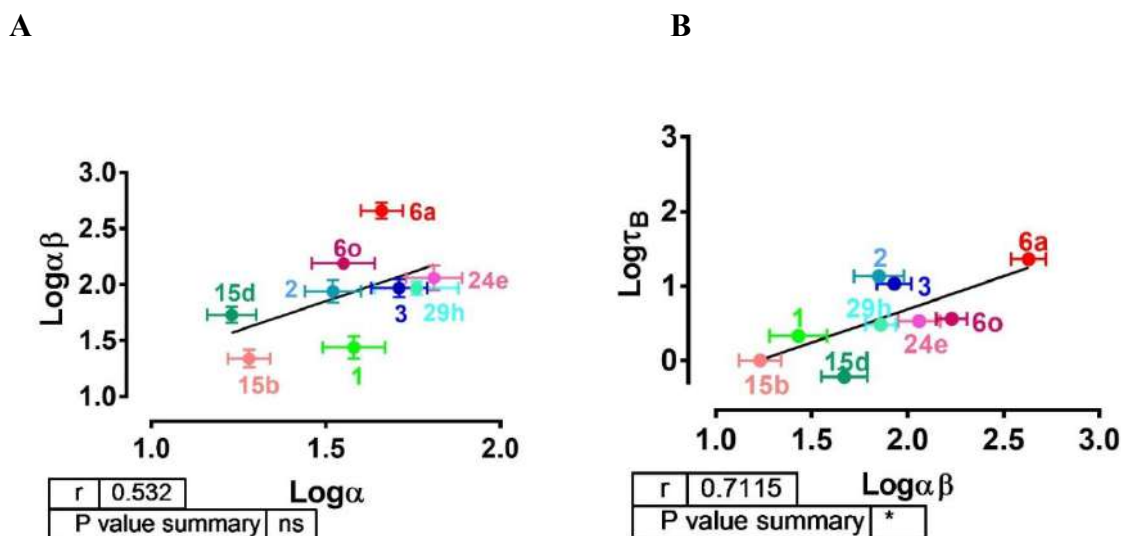


Figure 5. Correlation analysis of binding and functional parameter estimated for the selected PAMs at the M₁ mAChR. **A.** Binding cooperativity (α) estimates from whole cell radioligand binding assays and functional cooperativity (β) estimates from IP₁ accumulation assays. **B.** functional cooperativity and intrinsic efficacy (τ_B) estimated from IP₁ accumulation assays. The solid line is the line of best fit.

As it was suggested by Alt and co-workers (ALT et al., 2016), M₁ PAMs with weak agonist activity and appreciable potentiation of ACh response might have better *in vivo* safety profiles by fine-tuning native receptor signaling. Our previous studies demonstrate that generally the magnitude of ACh potentiation by an allosteric modulator ($\alpha\beta$) is correlated to an increase in the intrinsic efficacy (τ_B) of the PAM. However, particular structural modifications can tune specifically one of the allosteric features over the other (MISTRY et al., 2013, 2015, 2016). The results of the present study also show a direct relationship between Log τ_B and Log $\alpha\beta$ (Figure 5B), consistent with a two-state model of action, where the functional cooperativity of a PAM tracks with the degree of orthosteric agonist efficacy and stimulus-response coupling (CANALS et al., 2012; CHRISTOPOULOS, 2014). Although such a mechanism can result in higher degrees of potentiation for stronger agonists or for more amplified (e.g. downstream) signaling pathways, it does not predict biased modulation. Intriguingly a recent study by DAVOREN et al. (2017) suggested that even M₁ PAMs with weak agonist activity could exhibit cholinergic side effects (lead compound **4**, Figure 1). However, it remains unclear whether this was a chemotype-specific effect since the fused lactam ring in **4** is solely a covalent formalization of the IMHB present in **3**. Although compounds **2**, **3** and **4** (DAVOREN et al., 2016b, 2017; ROOK et al., 2017) were considered highly selective for the M₁ mAChR when tested against a broad panel of off-targets (GPCRs, ion channels, nuclear transporters, kinases and enzymes), their potential effects on the

acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE), key enzymes in the cholinergic system regulation, is unclear. The assay panels consisting of 30 and 68 targets (by Pfizer (DAVOREN et al., 2016a) and Vanderbilt (ROOK et al., 2017) studies, respectively) tested against **2** did not include the AChE or BChE activities. For compounds **3** and **4**, 76 off-target proteins were tested, but the panels were not described (DAVOREN et al., 2016b, 2017).

Notably, a M₁ PAM devoid of AEs (compound **5**) was recently developed by Vanderbilt Center for Neuroscience Drug Discovery (ROOK et al., 2017). This fluorinated indole derivative displayed stronger modulatory effects than direct agonist activity (Figure 1). The IMHB, typically found on structural related compounds (as seen in **2**) is not present in this compound. Although the extirpation of the IMHB in our series also resulted in compounds with lower τ_B values, further studies are required to link structural features of M₁ PAMs to their *in vivo* profile.

■ CONCLUSIONS

In this study, we reported the synthesis and optimization of azaindole, indole and pyrrole derivatives inspired by prototypical M₁ PAM-agonist, PF-06764427 (**2**) (DAVOREN et al., 2016a) and provided a detailed *in vitro* pharmacological evaluation of selected compounds within our series and three reference M₁ PAMs from literature, BQCA (**1**), PF-06764427 (**2**) and PF-06767832 (**3**). Although some of the indole and azaindole scaffolds were evaluated in recent studies by Pfizer (DAVOREN et al., 2016a) and Vanderbilt University (ROOK et al., 2017), we were able to obtain a series of compounds bearing a wider range of structural modifications. Typically, the 2-hydroxycyclohexyl (as in **6a**) and 2-hydroxytetrahydropyran-3-yl motifs (as in **6b**) are present in the structure of several M₁ mAChR PAM-agonists; here we have demonstrated that many other cyclic motifs, such as the cyclohexyl as in **6g**, the bulky polyhydroxylated furanoside as in **6f** and the aromatic phenyl group as in **6k**, are tolerated on the top part of the molecule without suffering significant changes to the allosteric effects. This represents an exceptional opportunity to optimize physicochemical properties, and to link structural features to pharmacological parameters, and ultimately to *in vivo* response profiles of the M₁ PAMs.

We showed that unprecedented modifications, such as the substitution of the amide hydrogen by short alkyl chains (as in **15b**, **15d**) and the deletion of the core fused aryl ring (as in **24e**), yielded promising PAMs with weak agonist activities. Interestingly, the removal of the cyclic top part (**6m-p**, Figure 3A) and the elimination of the IMHB (in **15a**, **15b**, **15d**, **18b** and **18c**, Figure 3B) were not too detrimental to the modulatory effect of the M₁ PAMs. Similarly, the deletion of the heteroaromatic nitrogen in the fused pyridine ring, by either replacing it with a carbon (**24a-d**) or removing the aromatic ring (compound **24e**) did not affect the modulatory response (Figure 4A). Modifications to the benzyl pendant in the original structure **6a** (Figure 4B) provided compounds with diverse pharmacological behaviors. The *N,N*-disubstituted series stand out with compounds presenting a modulatory effect similar to the reference PAM **1** but much lower inherent agonism. Compound **24e** bears a pyrrole core and represents a new scaffold to M₁ PAMs, thus offering a promising lead for future structure-activity studies of this class of compounds.

Our detailed analysis of the allosteric features of selected M₁ PAMs revealed diverse allosteric profiles (Table 1). Overall, when compared to the reference molecule **1**, all the selected compounds but our prototypical PAM **6a** have lower affinities (pK_B) at the M₁ mAChR, however, except for **15d**, they all display similar binding cooperativities with

ACh (α). Interestingly, all modifications, except *N,N*-disubstituted carboxamides, which display the weakest intrinsic efficacies (**15b** and **15d**), result in higher functional cooperativities with ACh ($\alpha\beta$), when compared to **1**. The significant difference between $\text{Log}\alpha$ and $\text{Log}\alpha\beta$ values for **6a**, **6o** and **15d** indicates that the potentiation of ACh signaling by these PAMs is derived from both modulation of ACh affinity and efficacy, whereas all the other PAMs are mainly affinity modulators. Within our series, only **6a** has higher intrinsic efficacy compared to **1**, and generally, the degree of ACh potentiation correlates with the intrinsic efficacy of PAMs, consistent with a two-state model of allosterism. Taken all together, we suggest compound **15d** as a promising PAM for future studies as it has appreciable affinity at the M_1 mAChR, functional cooperativity in the same range of the reference PAM **1** yet possessing significantly lower intrinsic efficacy (Table 1). Our detailed pharmacological evaluations provided novel insights into the SAR at the M_1 mAChR, which may aid in predicting *in vivo* efficacy and AEs liability of M_1 PAMs.

■ EXPERIMENTAL SECTION

Chemistry. Chemicals and solvents were purchased from standard suppliers and used without further purification. Davisil silica gel (40–63 μm), for flash column chromatography (FCC), was supplied by Grace Davison Discovery Sciences (Victoria, Australia), and deuterated solvents were purchased from Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (distributed by Novachem PTY. Ltd., Victoria, Australia). PF-06764427 and PF-06767832 were purchased from Sigma-Aldrich. Reactions were monitored by thin layer chromatography on commercially available precoated aluminium-backed plates (Merck Kieselgel 60 F_{254}). Visualization was by examination under UV light (254 and 366 nm). Appropriate staining was carried out using a solution of ninhydrin (in ethanol) to visualize primary and secondary amines. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance Nanobay III 400 MHz Ultrashield Plus spectrometer at 400.13 and 100.62 MHz, respectively. Chemical shifts (δ) were recorded in parts per million (ppm) with reference to the chemical shift of the deuterated solvent. Coupling constants (J) were recorded in Hz, and the significant multiplicities described by singlet (s), doublet (d), triplet (t), quadruplet (q), broad (br), multiplet (m), doublet of doublets (dd), and doublet of triplets (dt). Two-dimensional (2D) experiments including HSQC and HMBC were used to assign the compounds only when necessary. LC-MS were run to verify reaction outcome and purity using the following system: Agilent 6120 Series Single Quad coupled to an Agilent 1260 Series HPLC; Buffers: A, 0.1% formic acid in H_2O ; B, 0.1% formic acid in MeCN; The gradient was: 0–1 min 95% buffer A and 5% buffer B, from 1 to 2.5 min up to 0% buffer A and 100% buffer B, held at this composition until 3.8 min, 3.8–4 min 95% buffer A and 5% buffer B, held until 5 min at this composition; the flow rate was 0.5 mL/min and total run time was 5 min at a Poroshell 120 EC-C18 $50 \times 3.0 \text{ mm } 2.7 \mu\text{m}$ column. Retention times (t_{R}) are quoted, in minutes, for all final compounds. Mass spectra were acquired in positive and negative ion mode with a scan range of 100–1000 m/z . UV detection was carried out at 214 and 254 nm. HRMS analyses were carried out on an Agilent 6224 TOF LC/MS spectrometer coupled to an Agilent 1290 Infinity (Agilent, Palo Alto, CA). Preparative HPLC was performed using an Agilent 1260 infinity coupled with a binary preparative pump and Agilent 1260 FC-PS fraction collector, using Agilent OpenLAB CDS software (Rev C.01.04), and an Agilent $7 \mu\text{m}$ XDB-C8 $21.2 \times 250 \text{ mm}$ column. The following buffers were used: buffer A, 0.1% TFA in H_2O ; buffer B, 0.1% TFA in MeCN, with sample being run at a gradient of 5% buffer B to 100% buffer B over 10 min, at a flow rate of 20 mL/min. All screening compounds were of >95% purity.

General Procedure A: Amide Coupling. A mixture of the carboxylic acid (1.0 equiv) and HCTU (1.2 equiv) in DMF (1 mL) was stirred for 5 min until a homogenous suspension was observed. A solution of the respective amine (1.2 equiv) and DIPEA (2 equiv) in DMF (1 mL) was added dropwise and the reaction was stirred overnight at rt. DMF was co-evaporated with water and ethanol under reduced pressure at 50 °C. The residue was diluted with 1 M Na₂CO₃ solution (80 mL) and extracted with EtOAc (3 × 80 mL). The combined organic layers were washed with brine (80 mL), filtered over anhydrous Na₂SO₄ and dried under reduced pressure. Unless stated otherwise, the crude products were purified by flash column chromatography.

General Procedure B: N-Alkylation. A mixture of the carboxamide (1 equiv), the respective benzyl halide (1 equiv) and K₂CO₃ (2 equiv) in DMF (1 mL/0.2 mmol of starting material) was stirred at rt overnight. DMF was co-evaporated with water and ethanol under reduced pressure at 50 °C. Unless stated otherwise, crude products were purified by flash column chromatography.

N-((1*S*,2*S*)-2-Hydroxycyclohexyl)-1-(4-(1-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl)benzyl)-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine-3-carboxamide (**6a**). Compound **9a** (50 mg, 0.19 mmol) and **10** (40 mg, 0.19 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent CHCl₃/MeOH 100:1) to afford **6a** as a white solid (73 mg, 89%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.77 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.49 (dd, *J* = 4.7/1.2 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.09 (dd, *J* = 8.3/1.2 Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.30 (dd, *J* = 8.3/4.7 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 5.50 (s, 2H), 4.79 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.77–3.69 (m, 1H), 3.46–3.38 (m, 1H), 2.08–2.00 (m, 1H), 1.92–1.85 (m, 1H), 1.68–1.60 (m, 2H), 1.37–1.20 (m, 4H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 165.2, 143.5, 143.3, 135.9, 135.4, 134.1, 132.4, 129.8, 127.8, 127.6, 125.4, 122.4, 118.8, 117.2, 109.5, 72.8, 54.4, 50.0, 37.5, 33.7, 31.2, 24.0, 23.6. HRMS *m/z* [M+H]⁺ (Q-TOF/ESI) C₂₅H₂₈N₅O₂ calcd: 430.2243; found: 430.2247. LC-MS *t*_R = 2.99.

N-((3*R*,4*S*)-3-Hydroxytetrahydro-2*H*-pyran-4-yl)-1-(4-(1-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl)benzyl)-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine-3-carboxamide (**6b**). Compound **9b** (25 mg, 0.10 mmol) and **10** (20 mg, 0.10 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent CHCl₃/MeOH 100:1) to afford **6b** as a white solid (26 mg, 62%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.83 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.50 (dd, *J* = 4.7/1.2 Hz, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.08 (dd, *J* = 8.3/1.2 Hz, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.51 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 8.0

Hz, 2H), 7.24 (dd, $J = 8.3/4.7$ Hz, 1H), 5.50 (s, 2H), 5.18 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 3.94–3.87 (m, 1H), 3.87–3.78 (m, 5H), 3.52–3.45 (m, 1H), 3.45–3.40 (m, 1H), 3.16–3.10 (m, 1H), 2.12–2.05 (m, 1H), 1.58–1.46 (m, 1H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 163.0, 144.0, 143.1, 136.5, 136.3, 134.8, 132.7, 129.7, 128.5, 128.2, 125.7, 121.8, 119.8, 117.7, 110.3, 71.6, 69.3, 66.1, 52.2, 50.0, 39.1, 32.3. HRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Q-TOF/ESI) $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_3$ calcd: 432.2036; found: 432.2046. LC-MS $t_R = 2.87$.

N-((3S,4S)-4-Hydroxytetrahydro-2H-pyran-3-yl)-1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-pyrrolo [3,2-b]pyridine-3-carboxamide (6c). Compound **7c** (25 mg, 0.10 mmol) and **10** (20 mg, 0.10 mmol) was reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:1) to afford the **6c** as a white solid (25 mg, 60%). ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 8.85 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 8.50 (dd, $J = 4.4$ Hz, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.07 (m, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.51 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.30 (m, 3H), 5.50 (s, 2H), 5.12 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 4.01–3.95 (m, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.83–3.78 (m, 1H), 3.73–3.66 (m, 1H), 3.53–3.45 (m, 1H), 3.37–3.34 (m, 1H), 2.27–2.17 (m, 1H), 1.97–1.90 (m, 1H), 1.57–1.49 (m, 1H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 163.3, 144.1, 143.1, 136.5, 136.4, 134.8, 132.7, 129.7, 128.5, 128.3, 125.7, 121.9, 119.9, 117.8, 110.3, 68.3, 68.0, 65.0, 51.8, 50.0, 39.1, 33.4. HRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Q-TOF/ESI) $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_3$ calcd: 432.2036; found: 432.2048. LC-MS $t_R = 2.88$.

tert-Butyl(2-(1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamido)cyclohexyl)carbamate (6d). Compound **9d** (89 mg, 0.25 mmol) and **10** (51 mg, 0.25 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:1) to afford **6d** as a colourless oil (97 mg, 74%). ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.94 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.46 (dd, $J = 4.7/1.2$ Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.57 (dd, $J = 8.3/1.2$ Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.37 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.10–7.06 (m, 3H), 5.35 (d, $J = 7.0$, 1H), 5.25 (s, 2H), 3.99–3.90 (m, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.50–3.40 (m, 1H), 2.23–2.16 (m, 1H), 2.11–2.04 (m, 1H), 1.78–1.67 (m, 2H), 1.57–1.30 (m, 4H), 1.21 (s, 9H). LRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (TOF ES $^+$) 529.2.

N-((1S,2S)-2-Hydroxycyclopentyl)-1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (6e). Compound **9e** (61 mg, 0.25 mmol) and **10** (51 mg, 0.25 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:1) to afford **6e** as a white solid (84 mg, 80%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.43 (dd, $J = 4.6/0.8$ Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.81 (dd, $J = 8.3/0.8$ Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.42 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.17 (dd, $J = 8.3/4.6$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 5.33 (s, 2H), 4.22–4.11 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 2.28–2.17 (m, 1H), 2.06–2.96 (m,

1H), 1.88–1.74 (m, 2H), 1.69–1.57 (m, 2H). ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 165.0, 143.6, 143.2, 135.9, 135.2, 134.0, 132.4, 129.8, 127.8, 127.6, 125.4, 122.3, 118.8, 117.2, 109.2, 77.6, 58.0, 50.0, 37.6, 31.7, 29.7, 20.4. HRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Q-TOF/ESI) $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_2$ calcd: 416.2087; found: 416.2087. LC-MS t_{R} = 3.00.

N-((2R)-2-((3R,4S)-3,4-Dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)-2-hydroxyethyl)-1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (6f). Compound **9f** (36 mg, 0.11 mmol) and **10** (24 mg, 0.11 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:1) to afford **6f** as a white oil (32 mg, 58%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.40 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.73 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.37 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.10 (m, 3H), 5.29 (s, 2H), 4.14 (br s, 1H), 4.07 (br s, 1H), 4.00–3.94 (m, 2H), 3.85–3.81 (m, 4H), 3.79–3.75 (m, 1H), 3.74–3.72 (m, 1H), 3.62–3.55 (m, 1H). ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 165.3, 143.6, 143.2, 136.0, 135.3, 134.0, 132.4, 129.7, 127.8, 127.7, 125.4, 122.3, 118.7, 117.2, 109.4, 86.6, 78.8, 77.4, 73.3, 70.1, 50.0, 42.0, 37.6. HRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Q-TOF/ESI) $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_5$ calcd: 478.2090; found: 478.2085. LC-MS t_{R} = 2.77.

N-Cyclohexyl-1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (6g). Compound **9g** (61 mg, 0.25 mmol) and **10** (51 mg, 0.25 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:1) to afford **6g** as a white solid (68 mg, 66%). ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.85 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 8.48 (dd, J = 4.2/1.2 Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.59–7.53 (m, 2H), 7.39–7.35 (m, 2H), 7.13–7.07 (m, 3H), 5.29 (s, 2H), 4.08 (br s, 1H), 3.91 (s, 3H), 2.07–1.95 (m, 2H), 1.82–1.73 (m, 2H), 1.65–1.23 (m, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 162.9, 143.7, 143.6, 136.7, 135.2, 133.3, 132.2, 129.6, 127.6, 127.0, 126.3, 122.4, 118.0, 117.1, 111.4, 50.8, 47.4, 47.3, 39.1, 33.3, 33.2, 25.8, 24.8. HRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Q-TOF/ESI) $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}$ calcd: 414.2294; found: 414.2289. LC-MS t_{R} = 3.00.

1-(4-(1-Methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-N-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (6h). Compound **9h** (25 mg, 0.10 mmol) and **10** (20 mg, 0.10 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:1) to afford **6h** as a white solid (26 mg, 63%). ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.96 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.48 (dd, J = 4.7/1.2 Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.60 (dd, J = 8.3/1.2 Hz, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.39 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.20–7.10 (m, 3H), 5.30 (s, 2H), 4.33–4.25 (m, 1H), 4.03–3.97 (m, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.61–3.54 (m, 2H), 2.07–2.00

(m, 2H), 1.78–1.67 (m, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 163.2, 143.8, 143.6, 136.7, 135.2, 133.2, 132.9, 129.7, 127.7, 127.0, 126.0, 122.4, 118.2, 117.2, 111.0, 66.8, 66.7, 50.9, 44.8, 44.7, 39.1, 33.3. HRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Q-TOF/ESI) $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_2$ calcd: 416.2087; found: 416.2095. LC-MS t_R = 2.95.

tert-Butyl 4-(1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamido)piperidine-1-carboxylate (6i). Compound **9i** (34 mg, 0.10 mmol) and **10** (20 mg, 0.10 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:1) to afford **6i** as a light yellow oil (30 mg, 60%). ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.96 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.46 (dd, J = 4.6/1.2 Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.60 (dd, J = 8.3/1.2 Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.38 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.14–7.06 (m, 3H), 5.29 (s, 2H), 4.28–4.20 (m, 1H), 4.05–3.95 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.12–3.01 (m, 2H), 2.06–1.98 (m, 2H), 1.65–1.55 (m, 2H), 1.46 (s, 9H). LRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (TOF ES^+) 515.2.

N-((1R,4R)-4-Hydroxycyclohexyl)-1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (6j). Compound **9j** (40 mg, 0.15 mmol) and **10** (31 mg, 0.15 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 20:1) to afford **6j** as a white solid (62 mg, 94%). ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.80 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.44 (dd, J = 4.7/1.1 Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.58 (dd, J = 8.4/1.1 Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.38 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.10 (m, 3H), 5.27 (s, 2H), 4.08–3.97 (m, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.74–3.64 (m, 1H), 2.50–2.32 (m, 1H), 2.19–2.09 (m, 2H), 2.07–1.98 (m, 2H), 1.52–1.40 (m, 4H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 163.3, 143.7, 143.6, 136.7, 135.4, 133.3, 132.8, 129.7, 127.7, 127.1, 126.0, 122.4, 118.2, 117.2, 111.3, 69.7, 50.8, 47.0, 46.9, 39.0, 34.0, 30.9, 30.8. HRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Q-TOF/ESI) $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_2$ calcd: 430.2243; found: 430.2247. LC-MS t_R = 2.93.

1-(4-(1-Methyl-1H-pyrazol-3-yl)benzyl)-N-phenyl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (6k). Compound **9k** (15 mg, 0.06 mmol) and **10** (15 mg, 0.06 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:1) to afford **6k** as a white solid (16 mg, 64%). ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 10.96 (s, 1H), 8.61–8.58 (m, 2H), 8.16 (dd, J = 8.3/1.2 Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.77 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.53 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.41–7.32 (m, 5H), 7.12–7.07 (m, 1H), 5.55 (s, 2H), 3.83 (s, 3H). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 161.6, 144.2, 142.8, 139.4, 137.2, 136.5, 134.7, 132.8, 129.9, 129.2, 128.6, 128.3, 125.7, 123.7, 121.8, 120.4, 119.6, 118.1, 109.9, 50.2,

39.1. HRMS m/z $[M+H]^+$ (Q-TOF/ESI) $C_{25}H_{22}N_5O$ calcd: 408.1824; found: 408.1822. LC-MS t_R = 3.46.

N-(2-Hydroxyphenyl)-1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-3-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (**6l**). Compound **9l** (35 mg, 0.14 mmol) and **10** (35 mg, 0.14 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by preparative HPLC to afford **6l** as a colourless oil (10 mg, 18%). 1H NMR (DMSO- d_6) δ 10.96 (s, 1H), 10.02 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.54 (dd, J = 4.6/1.2 Hz, 1H), 8.36 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.13 (dd, J = 8.3/1.2 Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.52 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.36–7.28 (m, 3H), 6.92–6.88 (m, 2H), 6.84–6.79 (m, 1H), 5.54 (s, 2H), 3.83 (s, 3H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 161.6, 146.9, 144.2, 142.9, 137.2, 136.5, 134.8, 132.8, 129.7, 128.6, 128.3, 128.0, 127.5, 125.7, 121.8, 120.6, 120.0, 119.5, 118.0, 115.2, 110.7, 50.2, 39.1. HRMS m/z $[M+H]^+$ (Q-TOF/ESI) $C_{25}H_{22}N_5O_2$ calcd: 424.1773; found: 424.1767. LC-MS t_R = 3.57.

1-(4-(1-Methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (**6m**). Compound **9m** (20 mg, 0.12 mmol) and **10** (24 mg, 0.12 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent $CHCl_3/MeOH$ 100:1) to afford **6m** as a white solid (32 mg, 82%). 1H NMR (DMSO- d_6) δ 8.48 (dd, J = 4.7/1.2 Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.23 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 8.10–8.04 (m, 2H), 7.81 (s, 1H), 7.52 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.40 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.26 (dd, J = 8.3/4.7 Hz, 1H), 5.49 (s, 2H), 3.83 (s, 3H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 164.7, 144.1, 143.3, 136.5, 134.8, 132.8, 129.7, 128.6, 128.3, 125.7, 121.8, 119.8, 117.7, 110.6, 50.0, 39.1. HRMS m/z $[M+H]^+$ (Q-TOF/ESI) $C_{19}H_{18}N_5O$ calcd: 332.1511 found: 332.1508. LC-MS t_R = 2.81.

N-Methyl-1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (**6n**). Compound **9n** (12 mg, 0.06 mmol) and **10** (16 mg, 0.06 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent $CHCl_3/MeOH$ 100:1) to afford **6n** as a white solid (16 mg, 72%). 1H NMR (DMSO- d_6) δ 8.59 (q, J = 5.0 Hz, 1H), 8.48 (dd, J = 4.3/0.9 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.07 (m, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.51 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.30 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.25 (dd, J = 8.4/4.3 Hz, 1H), 5.49 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 2.92 (d, J = 5.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 163.8, 143.9, 143.1, 136.5, 136.1, 134.9, 132.7, 129.7, 128.6, 128.3, 125.7, 121.8, 119.8, 117.7, 110.5, 50.0, 39.1, 25.8. HRMS m/z $[M+H]^+$ (Q-TOF/ESI) $C_{20}H_{20}N_5O$ calcd: 346.1668 found: 364.1668. LC-MS t_R = 2.87.

N-Ethyl-1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (6o). Compound **9o** (19 mg, 0.10 mmol) and **10** (21 mg, 0.10 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent CHCl₃/MeOH 20:1) to afford **6o** as a white solid (22 mg, 60%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.68 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.48 (dd, *J* = 4.7/0.9 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.10–8.06 (m, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.51 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.26 (dd, *J* = 8.4/4.7 Hz, 1H), 5.49 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.45–3.37 (m, 2H), 1.71 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 163.1, 144.0, 143.1, 136.5, 136.2, 134.9, 132.7, 129.7, 128.6, 128.3, 125.7, 121.8, 119.8, 117.7, 110.4, 50.0, 39.1, 33.5, 15.8. HRMS *m/z* [M+H]⁺ (Q-TOF/ESI) C₂₁H₂₂N₅O calcd: 360.1824, found: 360.1825. LC-MS *t*_R = 2.97.

N-(2-Hydroxyethyl)-1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (6p). Compound **9p** (25 mg, 0.12 mmol) and **10** (25 mg, 0.12 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent EtOAc/MeOH 20:1) to afford **6p** as a colourless oil (31 mg, 69%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.86 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.49 (dd, *J* = 4.7/0.8 Hz, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.09–8.05 (m, 2H), 7.81 (s, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.25 (dd, *J* = 8.4/4.7 Hz, 1H), 5.49 (s, 2H), 4.84 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.59–3.54 (m, 2H), 3.51–3.45 (m, 2H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 163.3, 144.0, 143.1, 136.5, 136.3, 134.9, 132.7, 129.7, 128.5, 128.3, 125.7, 121.8, 119.8, 117.7, 110.5, 60.7, 50.0, 41.5, 39.1. HRMS *m/z* [M+H]⁺ (Q-TOF/ESI) C₂₁H₂₂N₅O₂ calcd: 376.1773, found: 376.1779. LC-MS *t*_R = 2.80.

N-((1S,2S)-2-Aminocyclohexyl)-1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (6q). The *N*-Boc protected intermediate **6d** (80 mg, 0.15 mmol) was dissolved in DCM (2 mL), cooled in an ice bath and TFA (200 μL, 10 equiv) was added dropwise. The reaction was stirred at rt overnight. The mixture was then diluted with 1 M NaOH solution (50 mL) and extracted with EtOAc (5 × 50 mL) and the combined organic layers were washed with brine (100 mL), filtered over anhydrous Na₂SO₄ and dried under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (eluent CHCl₃/MeOH 20:1) to afford **6q** as a white solid (44 mg, 67%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.69 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.50 (dd, *J* = 4.7/1.2 Hz, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.10 (dd, *J* = 8.4/1.2 Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.27 (dd, *J* = 8.4/4.7 Hz, 1H), 5.50 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.72–3.71 (m, 1H), 2.65–2.60 (m, 1H), 2.00–1.85 (m, 2H), 1.70–1.60 (m, 2H), 1.34–1.17 (m, 4H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 163.3, 144.0, 143.2, 136.5, 136.3, 134.8, 132.7, 129.7, 128.6, 128.3, 125.7, 121.9, 119.8, 117.8, 110.5, 55.0, 54.5, 50.0, 39.1,

34.5, 32.5, 25.1, 24.6. HRMS m/z $[M+H]^+$ (Q-TOF/ESI) $C_{25}H_{29}N_6O$ calcd: 429.2403; found: 429.2404. LC-MS t_R = 2.83.

1-(4-(1-Methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-N-(piperidin-4-yl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (6r). The *N*-Boc protected intermediate **6i** (20 mg, 0.40 mmol) was dissolved in DCM (2 mL), cooled in an ice bath and TFA (300 μ L, 10 equiv) was added dropwise. The reaction was stirred at rt overnight. The mixture was then diluted with 1 M NaOH solution (50 mL) and extracted with EtOAc (5×50 mL) and the combined organic layers were washed with brine (100 mL), filtered over anhydrous Na_2SO_4 and dried under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (eluent $CHCl_3/MeOH$ 20:1) to afford **6r** as a yellow solid (14 mg, 86%). 1H NMR ($DMSO-d_6$) δ 8.73 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.48 (dd, J = 4.7/1.2 Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.09–8.04 (m, 2H), 7.79 (s, 1H), 7.49 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.28 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.25 (dd, J = 4.7/8.3 Hz, 1H), 5.48 (s, 2H), 4.02–3.92 (m, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.03–2.96 (m, 1H), 2.69–2.59 (m, 1H), 1.93–1.84 (m, 2H), 1.47–1.19 (m, 4H). ^{13}C NMR ($DMSO-d_6$) δ 163.2, 144.8, 143.9, 137.5, 137.1, 135.6, 133.5, 130.5, 129.3, 129.1, 126.5, 122.6, 120.7, 118.5, 111.1, 50.8, 49.8, 46.5, 45.5, 39.9, 34.0, 30.3. HRMS m/z $[M+H]^+$ (Q-TOF/ESI) $C_{24}H_{27}N_6O$ calcd: 415.2246; found: 415.2246. LC-MS t_R = 2.75.

1-(4-(1-Methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-N-(4-oxocyclohexyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (6s). Cyclohexanol carboxamide **6j** (40 mg, 0.10 mmol) was dissolved in acetone (10 mL), cooled in an ice bath and Jones reagent (20 μ L, 0.4 equiv) was added [Jones reagent: 0.5 g CrO_3 , 0.5 mL H_2SO_4 , 1.5 mL H_2O]. The reaction was allowed to warm to room temperature and stirred overnight. The mixture was then diluted with water (75 mL) and extracted with $CHCl_3$ (3×75 mL) and the combined organic layers were washed with brine (75 mL), filtered over anhydrous Na_2SO_4 and dried under reduced pressure. This crude product was purified by FCC (eluent $CHCl_3/MeOH$ 100:1) to afford **6s** as a white solid (5.3 mg, 13%). 1H NMR ($CDCl_3$) δ 9.14 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 8.48 (dd, J = 4.6/1.0 Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.64 (dd, J = 8.4/1.0 Hz, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.42 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.16–7.12 (m, 3H), 5.32 (s, 2H), 4.60–4.50 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 2.60–2.38 (m, 4H), 2.36–2.28 (m, 2H), 2.07–1.98 (m, 2H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 210.5, 163.3, 144.8, 144.6, 136.7, 135.2, 133.1, 133.0, 129.7, 127.7, 127.0, 126.1, 122.4, 118.3, 117.3, 110.9, 77.2, 76.9, 51.0, 45.2, 39.1, 39.0, 32.8. HRMS m/z $[M+H]^+$ (Q-TOF/ESI) $C_{25}H_{26}N_5O_2$ calcd: 428.2087; found: 428.2090. LC-MS t_R = 2.98.

(3S,4R)-4-Aminotetrahydro-2H-pyran-3-ol (7b) and *(3S,4S)-3-aminotetrahydro-2H-pyran-4-ol (7c)*. Neat aqueous ammonium hydroxide (3 mL, 20 equiv) was added to a

solution of 3,7-dioxabicyclo[4.1.0]heptane (200 mg, 0.50 mmol) in methanol (6 mL) and the reaction was stirred overnight at rt. Volatiles were removed under reduced pressure and the crude product was purified by FCC (eluent MeOH 100%) to afford **7c** (first band, $R_f = 0.250$, colorless viscous oil, 77 mg, 33%) and **7b** (second band, $R_f = 0.125$, white solid, 90 mg, 38%). Compound **7b**: ^1H NMR (CD_3OD) δ 3.92–3.83 (m, 2H), 3.45–3.30 (m, 2H), 3.06 (t, $J = 10.6$ Hz, 1H), 2.62–2.54 (m, 1H), 1.93–1.86 (m, 1H), 1.60–1.49 (m, 1H); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 72.8, 70.4, 66.4, 53.8, 32.3. Compound **7c**: ^1H NMR (CD_3OD) δ 3.91–3.82 (m, 2H), 3.45–3.32 (m, 1H), 3.26–3.18 (m, 1H), 3.03 (t, $J = 10.6$ Hz, 1H), 2.65–2.56 (m, 1H), 1.87–1.80 (m, 1H), 1.52–1.40 (m, 1H). ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 72.4, 70.4, 65.7, 53.8, 33.0.

tert-Butyl ((1R,2R)-2-aminocyclohexyl)carbamate (7d). A solution of di-*tert*-butyl dicarbonate (0.95 g, 4.13 mmol) in DCM (3 mL) was added dropwise to a cold (0 °C) solution of *trans*-1,2-diaminocyclohexane (1 mL, 8.3 mmol) in dioxane (5 mL) under vigorous stirring. After 30 min the reaction media was allowed to warm up to rt and then stirred overnight. The volatiles were removed under reduced pressure. The residue was diluted with 1 M Na_2CO_3 solution (50 mL) and extracted with DCM (5 \times 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (50 mL), filtered over anhydrous Na_2SO_4 and dried under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (eluent $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:1) to afford **7d** as a yellow oil (140 mg, 15%). ^1H NMR (CDCl_3) δ 4.46 (br s, 1H), 3.07 (br s, 1H), 2.29–2.20 (m, 1H), 1.95–1.84 (m, 2H), 1.66–1.60 (m, 2H), 1.45–1.37 (m, 1H), 1.38 (s, 9H), 1.25–0.99 (m, 4H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 156.1, 79.3, 57.6, 55.7, 35.2, 32.9, 28.4, 25.2, 25.0. LRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (TOF ES^+) 215.1.

N-((1S,2S)-2-Hydroxycyclohexyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (9a). 4-Azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (100 mg, 0.62 mmol) and *trans*-2-aminocyclohexanol (**7a**) (86 mg, 0.74 mmol) were reacted according to general procedure A. The crude extract was purified by FCC (eluent EtOAc/MeOH 20:1) to afford **9a** as a white solid (73 mg, 46%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.46 (dd, $J = 4.6/1.3$ Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.86 (dd, $J = 8.2/1.3$ Hz, 1H), 7.23 (dd, $J = 8.2/4.6$ Hz, 1H), 3.92–3.84 (m, 1H), 3.62–3.53 (m, 1H), 2.18–2.06 (m, 2H), 1.80–1.70 (m, 2H), 1.60–1.32 (m, 4H). LRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (TOF ES^+) 260.0.

N-((3R,4S)-3-Hydroxytetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (9b). Azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (100 mg, 0.62 mmol) and *trans*-4-aminotetrahydropuran-3-ol (**7b**) (86 mg, 0.74 mmol) were reacted according to general procedure A. The crude extract was purified by FCC (eluent EtOAc/MeOH 20:1) to afford

9b as a white solid (52 mg, 32%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.48 (dd, $J = 4.7/1.2$ Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.88 (dd, $J = 8.2/1.2$ Hz, 1H), 7.26 (dd, $J = 8.2/4.7$ Hz, 1H), 4.12–4.03 (m, 1H), 4.03–3.96 (m, 1H), 3.69–3.63 (m, 1H), 3.58–3.50 (m, 1H), 3.33–3.25 (m, 2H), 2.21–2.14 (m, 1H), 1.76–1.66 (m, 1H). LRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (TOF ES^+) 262.0.

N-((3*S*,4*S*)-4-Hydroxytetrahydro-2H-pyran-3-yl)-1H-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine-3-carboxamide (**9c**). Azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (100 mg, 0.62 mmol) and *trans*-3-aminotetrahydropuran-4-ol (**7c**) (86 mg, 0.74 mmol) were reacted according to general procedure A. The crude extract was purified by FCC (eluent EtOAc/MeOH 20:1) to afford **9c** as a colourless oil (25 mg, 23%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.52–8.48 (m, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.89–7.86 (m, 1H), 7.30–7.25 (m, 1H), 4.20–4.08 (m, 1H), 4.08–3.98 (m, 1H), 3.94–3.85 (m, 1H), 3.67–3.57 (m, 1H), 3.46–3.38 (m, 1H), 3.35–3.28 (m, 1H), 2.17–2.08 (m, 1H), 1.76–1.66 (m, 1H). LRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (TOF ES^+) 261.9.

tert-Butyl ((1*S*,2*S*)-2-(1H-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine-3-carboxamido)cyclohexyl)carbamate (**9d**). Azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (100 mg, 0.62 mmol) and *tert*-butyl ((1*R*,2*R*)-2-aminocyclohexyl) carbamate (**7d**) (115 mg, 0.74 mmol) were reacted according to general procedure A. The crude extract was purified by FCC (eluent EtOAc/MeOH 20:1) to afford **9d** as a yellow oil (90 mg, 41%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.47 (dd, $J = 4.6/0.8$ Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.84 (dd, $J = 8.2/0.8$ Hz, 1H), 7.21 (dd, $J = 8.2/4.6$ Hz, 1H), 3.92–3.82 (m, 1H), 3.55–3.45 (m, 1H), 2.79 (s, 9H), 2.18–2.08 (m, 1H), 2.05–1.98 (m, 1H), 1.80–1.70 (m, 2H), 1.50–1.32 (m, 4H). m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (TOF ES^+) 359.0

N-((1*S*,2*S*)-2-Hydroxycyclopentyl)-1H-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine-3-carboxamide (**9e**). Azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (100 mg, 0.62 mmol) and *trans*-2-aminocyclopentanol hydrochloride (**7e**) (101 mg, 0.74 mmol) were reacted according to general procedure A. The crude extract was purified by FCC (eluent EtOAc/MeOH 20:1) to afford **9e** as a white solid (68 mg, 45%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.44 (dd, $J = 4.7/1.3$ Hz, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.82 (dd, $J = 8.3/1.3$ Hz, 1H), 7.18 (dd, $J = 8.3/4.7$ Hz, 1H), 4.22–4.14 (m, 2H), 2.30–2.21 (m, 1H), 2.08–1.98 (m, 1H), 1.88–1.82 (m, 2H), 1.75–1.65 (m, 2H). LRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (TOF ES^+) 245.9.

N-((2*S*)-2-((3*R*,4*S*)-3,4-Dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)-2-hydroxyethyl)-1H-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine-3-carboxamide (**9f**). Azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (100 mg, 0.62 mmol) and amino-1-deoxy-3,6-L-anhydrogalactose (DALLAGNOL et al., 2017) (**7f**) (77 mg, 0.74 mmol) were reacted according to general procedure A. The crude extract was purified by two FCC (eluent 1: EtOAc/MeOH 4:1; eluent 2: DCM/MeOH 100:1 to 10:1) to afford **9f** as a

colourless oil (18 mg, 29 % yield). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.46 (d, J = 4.3 Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.86 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 7.23–7.18 (m, 1H), 4.15–4.10 (m, 1H), 4.12–4.04 (m, 1H), 4.00–3.96 (m, 2H), 3.87–3.79 (m, 1H), 3.80–3.70 (m, 2H), 3.61 (dd, J = 12.3/7.6 Hz, 1H). LRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (TOF ES^+) 308.1.

N-Cyclohexyl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (**9g**). Azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (100 mg, 0.62 mmol) and cyclohexylamine (**7g**) (85 μL , 0.74 mmol) were reacted according to general procedure A. The crude extract was purified by FCC (eluent EtOAc/MeOH 20:1) to afford **9g** as a yellow oil (60 mg, 40%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.47 (dd, J = 4.3/1.3 Hz, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.87 (dd, J = 8.2/1.3 Hz, 1H), 7.25 (dd, J = 8.2/4.3 Hz, 1H), 4.05–3.95 (m, 1H), 2.10–1.96 (m, 2H), 1.85–1.75 (m, 2H), 1.55–1.32 (m, 6H). LRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (TOF ES^+) 244.0.

N-(Tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (**9h**). Azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (100 mg, 0.62 mmol) and 4-aminotetrahydropyranol (**7h**) (83 μL , 0.74 mmol) were reacted according to general procedure A. The crude extract was purified by FCC (eluent EtOAc/MeOH 20:1) to afford **9h** as a colourless oil (52 mg, 34%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.47 (dd, J = 4.7/1.1 Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.89 (dd, J = 8.2/1.1 Hz, 1H), 7.26 (dd, J = 8.2/4.7 Hz, 1H), 4.25–4.35 (m, 1H), 4.04–3.96 (m, 2H), 3.64–3.55 (m, 2H), 2.05–1.97 (m, 2H), 1.80–1.68 (m, 2H). LRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (TOF ES^+) 246.0.

tert-Butyl 4-(1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamido)piperidine-1-carboxylate (**9i**). Azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (100 mg, 0.62 mmol) and 1-*N*-Boc-4-aminopiperidine (**7i**) (148 mg, 0.74 mmol) were reacted according to general procedure A. The crude extract was purified by FCC (eluent EtOAc/MeOH 20:1) to afford **9i** as a brown oil (86 mg, 40%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.51–8.45 (m, 1H), 8.16–8.12 (m, 1H), 7.92–7.86 (m, 1H), 7.29–7.22 (m, 1H), 4.24–4.14 (m, 1H), 4.05–3.96 (m, 2H), 3.19–3.07 (m, 2H), 2.09–2.00 (m, 2H), 1.67–1.54 (m, 2H), 1.48 (s, 9H). LRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (TOF ES^+) 345.1.

N-((1R,4R)-4-Hydroxycyclohexyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (**9j**). Azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (100 mg, 0.62 mmol) and *trans*-4-aminocyclohexanol hydrochloride (**7j**) (112 mg, 0.74 mmol) were reacted according to general procedure A. The crude extract was purified by FCC (eluent EtOAc/MeOH 20:1) to afford **9j** as a white solid (42 mg, 26%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.45 (dd, J = 4.7/1.3 Hz, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.85 (dd, J = 8.2/1.3 Hz, 1H), 7.22 (dd, J = 8.2/4.7 Hz, 1H), 3.94–3.84 (m, 1H), 3.69–3.59 (m, 1H), 2.15–2.05 (m, 2H), 2.06–1.98 (m, 2H), 1.55–1.32 (m, 4H). LRMS m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ (TOF ES^+) 258.0.

N-Phenyl-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine-3-carboxamide (**9k**). Azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (100 mg, 0.62 mmol) and aniline (**7k**) (86 μ L, 1.5 equiv) were reacted according to general procedure A. The crude extract was purified by FCC (eluent EtOAc/MeOH 20:1) to afford **9k** as a white solid (58 mg, 40%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.46 (dd, $J = 4.6/1.2$ Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.83 (dd, $J = 8.3/1.3$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.28 (dt, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.19 (dd, $J = 8.3/4.7$ Hz, 1H), 7.03 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H). LRMS m/z $[\text{M-H}]^+$ (TOF ES^+) 238.1.

N-(2-Hydroxyphenyl)-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine-3-carboxamide (**9l**). Azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (100 mg, 0.62 mmol) and 2-aminophenol (**7l**) (101 mg, 1.5 equiv) were reacted according to general procedure A. The crude extract was purified by FCC (eluent $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:2) to afford **9l** as a white solid (40 mg, 26%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.45 (br s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.97 (dd, $J = 8.0/1.5$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.17 (dd, $J = 8.0/4.2$ Hz, 1H), 6.89–6.77 (m, 3H). LRMS m/z $[\text{M-H}]^+$ (TOF ES^+) 253.9.

1*H*-Pyrrolo[3,2-*b*]pyridine-3-carboxamide (**9m**). A mixture of azaindole-3-carboxylic acid **8** (81 mg, 0.50 mmol) and HCTU (265 mg, 1.2 equiv) in DMF (1 mL) was stirred for 5 min until a fine homogenous suspension was observed. Concentrated ammonium hydroxide aqueous solution (28%, 3 equiv) was added dropwise and the reaction was stirred overnight at rt. The reaction media was diluted with 1 M Na_2CO_3 solution (80 mL) and extracted with EtOAc (3 x 80 mL) and the combined organic layers were washed with brine (80 mL), filtered over anhydrous Na_2SO_4 and dried under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (eluent EtOAc/MeOH 20:1) to afford **9m** as a white solid (19 mg, 23%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.47 (dd, $J = 4.0/0.6$ Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.86 (dd, $J = 8.1/0.6$ Hz, 1H), 7.23 (dd, $J = 8.1/4.0$ Hz, 1H). LRMS m/z $[\text{M+H}]^+$ (TOF ES^+) 162.0.

N-Methyl-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine-3-carboxamide (**9n**). Azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (100 mg, 0.62 mmol) and methylamine hydrochloride (**7n**) (50 mg, 0.74 mmol) reacted according to general procedure A. The crude extract was purified by FCC (eluent EtOAc/MeOH 20:1) to afford **9n** as a white solid (20 mg, 22%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.46 (dd, $J = 4.0/0.7$ Hz, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.86 (dd, $J = 8.2/0.7$ Hz, 1H), 7.24 (dd, $J = 8.2/4.0$ Hz, 1H), 3.03 (s, 3H). m/z $[\text{M+H}]^+$ (TOF ES^+) 176.0.

N-Ethyl-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridine-3-carboxamide (**9o**). Azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (100 mg, 0.62 mmol) and ethylamine (**7o**) (30% in ethanol) (150 μ L, 1.6 equiv) reacted according to general procedure A. The crude extract was purified by FCC (eluent

EtOAc/MeOH 20:1) to afford the **9o** as a yellow oil (25 mg, 22%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.47 (dd, $J = 4.0/1.0$ Hz, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.87 (dd, $J = 8.2/1.0$ Hz, 1H), 7.23 (dd, $J = 8.2/4.0$ Hz, 1H), 3.54 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.30 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H). LRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (TOF ES^+) 190.1.

N-(2-Hydroxyethyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (**9p**). Azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (100 mg, 0.62 mmol) and ethanolamine (**7p**) (60 μL , 1.6 equiv) reacted according to general procedure A. The crude extract was purified by FCC (eluent EtOAc/MeOH 10:1) to afford **9p** as a colourless oil (27 mg, 21%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.45 (dd, $J = 4.0/1.0$ Hz, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.85 (dd, $J = 8.2/1.0$ Hz, 1H), 7.22 (dd, $J = 8.2/4.0$ Hz, 1H), 3.79 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.63 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H). LRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (TOF ES^+) 206.1.

4-(4-(Chloromethyl)phenyl)-1-methyl-1H-pyrazole (**10**). A solution of **27a** (1.00 g, 5.30 mmol) in DCM (100 mL) was placed in an ice bath. Thionyl chloride (2 mL, 5.0 equiv) was added dropwise under vigorous stirring. The reaction mixture was allowed to warm to rt and stirred for 1 h. Saturated NaHCO_3 solution (100 mL) was added to the reaction mixture and the product was extracted with chloroform (3×100 mL). The combined organic layers were washed with brine (150 mL), filtered over anhydrous Na_2SO_4 and dried under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (eluent CHCl_3) to afford **10** as a white solid (840 mg, 76%). ^1H NMR (CDCl_3) 7.75 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.44 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.38 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 4.59 (s, 2H), 3.93 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3) 136.9, 135.4, 132.9, 129.2, 127.0, 125.8, 122.6, 46.2, 39.1. LRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (TOF ES^+) 207.0.

N,N-Dimethyl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (**14a**). Azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (100 mg, 0.62 mmol) and dimethylamine hydrochloride (76 mg, 1.5 equiv) were reacted according to general procedure A. The crude extract was purified by FCC (eluent EtOAc/MeOH 9:1) to afford **14a** as a white solid (22 mg, 18%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.46 (br s, 1H), 7.94 (br s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.30 (br s, 1H), 3.15 (s, 6H). LRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (TOF ES^+) 190.1.

N,N-Diethyl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (**14b**). Azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (100 mg, 0.62 mmol) and diethylamine (100 μL , 1.5 equiv) were reacted according to general procedure A. The crude extract was purified by FCC (eluent EtOAc/MeOH 9:1) to afford **14b** as a white solid (30 mg, 22%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.41 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.22 (dd, $J = 4.2/8.2$ Hz, 1H), 3.60 (br s, 4H), 1.40–1.10 (m, 6H). LRMS m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ (TOF ES^+) 216.0.

N,N-Diallyl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (14c). Azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (100 mg, 0.62 mmol) and diallylamine (115 μ L, 1.5 equiv) were reacted according to general procedure A. The crude extract was purified by FCC (eluent EtOAc/MeOH 9:1) to afford **14c** as a light yellow oil (25 mg, 18%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.47 (dd, $J = 5.2/1.1$ Hz, 1H), 8.09 (dd, $J = 8.3/1.1$ Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.39 (dd, $J = 8.3/5.2$ Hz, 1H), 6.00–5.90 (m, 2H), 5.23 (d, $J = 10.0$ Hz, 4H), 4.20 (d, $J = 5.6$ Hz, 4H). LCMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (TOF ES $^+$) 242.0.

N-Cyclohexyl-N-methyl-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (14d). A mixture of azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (300 mg, 1.85 mmol) and *N*-methylcyclohexanamine (**13d**) (314 mL, 2.22 mmol) reacted according to general procedure A. The crude product was purified by FCC (eluent EtOAc 100% \rightarrow EtOAc: MeOH 8:2) to afford **14d** as a white solid (82 mg, 17%). ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 11.68 (s, 1H), 8.38 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.82 (dd, $J = 8.2/1.5$ Hz, 1H), 7.16 (dd, $J = 8.2/4.6$ Hz, 1H), 4.45–4.21 (m, 0.5H, rotamer), 4.01–3.75 (m, 0.5H, rotamer), 2.90 (s, 3H), 1.84–1.64 (m, 4H), 1.62–1.47 (m, 3H), 1.43–0.77 (m, 3H). LRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (TOF ES $^+$) 258.0.

N,N-Dimethyl-1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (15a). A mixture of **14a** (22 mg, 0.12 mmol) and **10** (24 mg, 0.12 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:1) to afford **15a** as a white solid (22 mg, 53%). ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 8.42 (dd, $J = 4.6/1.3$ Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.00 (dd, $J = 8.1/1.3$ Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.52 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.29 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.19 (dd, $J = 8.1/4.6$ Hz, 1H), 5.46 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.04 (s, 6H). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 165.8, 143.9, 142.9, 136.5, 135.1, 135.0, 132.7, 128.7, 128.5, 128.3, 125.7, 121.9, 118.9, 117.3, 112.5, 49.8, 39.1, 38.6 (HSQC), 35.2 (HSQC). HRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Q-TOF/ESI) $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}$ calcd: 360.1824 found: 360.1828. LCMS $t_R = 2.80$.

N,N-Diethyl-1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (15b). A mixture of **14b** (19 mg, 0.09 mmol) and **10** (18 mg, 0.09 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:1) to afford **15b** as a white solid (19 mg, 55%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.41 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H), 7.90–7.86 (m, 3H), 7.79 (s, 1H), 7.52 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.24–7.18 (m, 3H), 5.46 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.60 (br s, 4H), 1.34–1.04 (m, 6H). ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 166.6, 143.3, 142.5, 136.0, 134.5, 132.7, 132.4, 129.2, 127.8, 127.5, 125.4, 122.4, 118.9,

117.1, 111.6, 49.8, 39.9 (HSQC), 37.5, 16.6 (HSQC). HRMS m/z $[M+H]^+$ (Q-TOF/ESI) $C_{23}H_{26}N_5O$ calcd: 388.2137, found: 388.2133. LCMS t_R = 2.87.

N,N-Diallyl-1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (15c). A mixture of **14c** (19 mg, 0.08 mmol) and **10** (16 mg, 0.08 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent $CHCl_3/MeOH$ 100:1) to afford **15c** as a white solid (15 mg, 46%). 1H NMR (CD_3OD) δ 8.44 (dd, J = 4.8/1.2 Hz, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.90 (dd, J = 8.4/1.2 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.52 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.23–7.19 (m, 3H), 5.92 (br s, 2H), 5.45 (s, 2H), 5.18 (br s, 4H), 4.18 (br s, 4H), 3.90 (s, 3H). ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 167.1, 143.5, 142.6, 136.0, 134.4, 133.3, 132.4, 130.2 (HSQC), 129.3, 127.8, 127.6, 125.4, 122.4, 118.9, 117.2, 116.6 (HSQC), 110.9, 49.8, 49.5 (HSQC), 37.5. HRMS m/z $[M+H]^+$ (Q-TOF/ESI) $C_{25}H_{26}N_5O$ calcd: 412.2137, found: 412.2137. LC-MS t_R = 2.94.

N-Cyclohexyl-N-methyl-1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (15d). A mixture of **14d** (50 mg, 0.19 mmol) and **10** (40 mg, 0.19 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent DCM 100% \rightarrow DCM: MeOH 9:1), followed by trituration with PET to afford **15d** as a colourless oil (38 mg, 46%). 1H NMR ($DMSO-d_6$) δ 8.40 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 8.15–8.04 (m, 2H), 7.99 (dd, J = 8.3/1.3 Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.54–7.45 (m, 2H), 7.27 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.18 (dd, J = 8.3/4.6 Hz, 1H), 5.46 (s, 2H), 4.54–4.11 (m, 1H), 3.84 (s, 3H), 2.91 (s, 3H), 1.85–1.64 (m, 4H), 1.62–1.44 (m, 3H), 1.28–0.79 (m, 3H). ^{13}C NMR (d_3 -MeOD) δ 170.8, 147.2, 146.6, 139.9, 138.5, 137.7, 136.3, 133.2, 131.8, 131.5, 129.4, 126.4, 122.8, 121.1, 115.6, 63.0, 58.0, 53.8, 41.5, 34.4, 33.3, 29.4; HRMS m/z $[M+H]^+$ $C_{26}H_{30}N_5O$ calcd: 428.2450; found 428.2444. LCMS t_R = 2.92.

Piperidin-1-yl(1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-3-yl)methanone (17a). Azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (100 mg, 0.62 mmol) and piperidine (91 μ L, 1.5 equiv) were reacted according to general procedure A. The crude extract was purified by FCC (eluent EtOAc/MeOH 10:1) to afford **17a** as a white solid (72 mg, 51%). 1H NMR (CD_3OD) δ 8.40 (dd, J = 4.8/1.2 Hz, 1H), 7.90 (dd, J = 8.1/1.2 Hz, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.23 (dd, J = 4.8/8.1 Hz, 1H), 3.80–3.45 (m, 4H), 1.80–1.50 (m, 6H). LRMS m/z $[M-H]^-$ (TOF ES $^+$) 230.0.

Pyrrolidin-1-yl(1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-3-yl)methanone (17b). Azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (100 mg, 0.62 mmol) and pyrrolidine (76 μ L, 1.5 equiv) reacted according to general procedure A. The crude product was purified by FCC (eluent EtOAc/MeOH 8:1) to afford

17b as a white solid (53 mg, 40%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.41 (dd, $J = 4.6/1.2$ Hz, 1H), 7.88 (dd, $J = 8.1/1.2$ Hz, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.22 (dd, $J = 4.6/8.1$ Hz, 1H), 3.70–3.60 (m, 4H), 2.05–1.98 (m, 2H), 1.96–1.88 (m, 2H). LRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (TOF ES^+) 216.0.

Azetidin-1-yl(1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-3-yl)methanone (17c). Azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (100 mg, 0.62 mmol) and azetidine hydrochloride (87 mg, 1.5 equiv) were reacted according to general procedure A. The crude product was purified by FCC (eluent EtOAc/MeOH 5:1) to afford **17c** as a white solid (57 mg, 45%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.48 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.92 (dd, $J = 8.4/1.3$ Hz, 1H), 7.27 (dd, $J = 8.3/4.4$ Hz, 1H), 4.45–4.38 (m, 2H), 4.28–4.20 (m, 2H), 2.43–2.34 (m, 2H). LRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (TOF ES^+) 202.0.

Morpholino(1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-3-yl)methanone (17d). Azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (80 mg, 0.50 mmol) and morpholine (100 μL , 1.2 equiv) were reacted according to general procedure A. The crude product was purified by FCC (eluent EtOAc/MeOH 10:1) to afford **17d** as a white solid (34 mg, 30%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.42 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.91 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.25 (dd, $J = 8.1/4.3$ Hz, 1H), 3.72 (br s, 8H). LRMS m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ (TOF ES^+) 232.0.

tert-Butyl 4-(1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carbonyl)piperazine-1-carboxylate (17e). Azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (80 mg, 0.5 mmol) and *N*-Boc piperazine (140 μL , 1.5 equiv) were reacted according to general procedure A. The crude extract was purified by FCC (eluent EtOAc/MeOH 10:1) to afford **17e** as a white solid (85 mg, 51%). ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.43 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.90 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.26 (dd, $J = 8.1/4.2$ Hz, 1H), 3.71 (br s, 4H), 3.55 (br s, 4H), 1.48 (s, 9H). LRMS m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ (TOF ES^+) 331.0.

(1-(4-(1-Methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-3-yl)(piperidin-1-yl)methanone (18a). Compound **17a** (38 mg, 0.17 mmol) and **10** (36 mg, 0.17 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude was purified by FCC (eluent $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:1) to afford **18a** as a white solid (59 mg, 88%). ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 8.42 (dd, $J = 4.6/1.3$ Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.00 (dd, $J = 8.3/1.3$ Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.52 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.29 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.16 (dd, $J = 8.3/4.6$ Hz, 1H), 5.45 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.54 (br s, 4H), 1.60–1.40 (m, 6H). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 164.2, 143.9, 142.9, 136.5, 135.1, 135.0, 132.7, 128.6, 128.5, 126.3, 125.6, 121.8, 118.8, 117.3, 112.4, 49.8, 39.1, 31.1, 26.2, 24.6. HRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Q-TOF/ESI) $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}$ calcd: 400.2137 found: 400.2136. LC-MS $t_R = 2.90$.

(1-(4-(1-Methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-3-yl)(pyrrolidin-1-yl)methanone (**18b**). Compound **17b** (36 mg, 0.17 mmol) and **10** (36 mg, 0.17 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent CHCl₃/MeOH 100:1) to afford **18b** as a white solid (64 mg, 98%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.42 (dd, *J* = 4.6/1.3 Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.98 (dd, *J* = 8.3/1.3 Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.16 (dd, *J* = 8.3/4.6 Hz, 1H), 5.46 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.70–3.61 (m, 2H), 3.53–3.47 (m, 2H), 1.90–1.76 (m, 4H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 164.1, 143.9, 142.9, 136.5, 135.1, 135.0, 132.7, 128.8, 128.5, 128.2, 125.6, 121.9, 118.8, 117.2, 113.6, 49.8, 48.2, 48.3, 39.1, 26.1, 24.5. HRMS *m/z* [M+H]⁺ (Q-TOF/ESI) C₂₃H₂₄N₅O calcd: 386.1981 found: 386.1980. LC-MS *t*_R = 2.80.

Azetidin-1-yl(1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-3-yl)methanone (**18c**). Compound **17c** (13 mg, 0.06 mmol) and **10** (12 mg, 0.06 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent CHCl₃/MeOH 100:2) to afford **18c** as a white solid (21 mg, 95%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.43 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.98 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.18 (dd, *J* = 8.0/4.1 Hz, 1H), 5.46 (s, 2H), 4.37 (br s, 2H), 4.02 (br s, 2H), 3.83 (s, 3H), 2.27–2.18 (m, 2H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 165.7, 144.1, 142.9, 136.5, 136.2, 135.0, 132.7, 129.2, 128.6, 128.3, 125.7, 121.8, 118.9, 117.3, 110.8, 52.3, 49.8, 48.2, 39.1, 15.8. HRMS *m/z* [M+H]⁺ (Q-TOF/ESI) C₂₂H₂₂N₅O calcd: 372.1824; found: 372.1824. LC-MS *t*_R = 2.75.

(1-(4-(1-Methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-3-yl)(morpholino)methanone (**18d**). Compound **17d** (34 mg, 0.14 mmol) and **10** (20 mg, 0.14 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent CHCl₃/MeOH 100:1) to afford **18d** as a white solid (32 mg, 58%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.42 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.19 (dd, *J* = 8.2/4.4 Hz, 1H), 5.46 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.69–3.54 (m, 8H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 164.5, 144.2, 142.6, 136.5, 136.0, 135.0, 132.7, 128.8, 128.5, 128.3, 125.7, 121.8, 119.0, 117.4, 111.5, 79.6, 66.9, 49.8, 39.1. HRMS *m/z* [M+H]⁺ (Q-TOF/ESI) C₂₃H₂₄N₅O₂ calcd: 402.1930 found: 402.1931. LC-MS *t*_R = 3.02.

tert-Butyl 4-(1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carbonyl) piperazine-1-carboxylate (**18e**). Compound **17e** (83 mg, 0.25 mmol) and **10** (52

mg, 0.25 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent CHCl₃/MeOH 100:1) to afford **18e** as a white solid (93 mg, 75%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.42 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.20 (dd, *J* = 8.5/4.4 Hz, 1H), 5.47 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.57 (br s, 4H), 3.42 (br s, 4H), 1.41 (s, 9H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 164.5, 154.3, 144.2, 142.7, 136.5, 136.1, 135.0, 132.7, 128.8, 128.6, 128.3, 125.7, 121.8, 119.0, 117.4, 111.6, 79.5, 65.4, 49.8, 39.1, 28.5, 15.6. HRMS *m/z* [M+H]⁺ (Q-TOF/ESI) C₂₈H₃₃N₆O₃ calcd: 501.2614 found: 501.2617. LC-MS *t*_R = 2.83.

(1-(4-(1-Methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-3-yl)(piperazin-1-yl)methanone (**18f**). *N*-Boc protected intermediate **18e** (20 mg, 0.04 mmol) was dissolved in DCM (2 mL), cooled in an ice bath and TFA (30 μL, 10 equiv) was added dropwise. The reaction was stirred overnight at rt. The mixture was then diluted with 1 M NaOH solution (50 mL) and extracted with EtOAc (5 × 50 mL) and the combined organic layers were washed with brine (50 mL), filtered over anhydrous Na₂SO₄ and dried under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (eluent CHCl₃/MeOH 20:1 to 1:1) to afford **18f** as a colourless oil (9 mg, 56%). ¹H NMR (CD₃OD) δ 8.42 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.90 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.51 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.26 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.25–7.18 (m, 1H), 5.46 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.69 (br s, 4H), 2.88 (br s, 4H). ¹³C NMR (CD₃OD) δ 165.6, 143.6, 142.3, 136.0, 134.4, 134.3, 132.4, 129.3, 127.8, 127.6, 125.4, 122.4, 119.0, 117.2, 110.5, 49.9, 48.4, 45.1, 37.5. HRMS *m/z* [M+H]⁺ (Q-TOF/ESI) C₂₃H₂₅N₆O calcd: 401.2090 found: 401.2092. LC-MS *t*_R = 2.75.

4,5-Dimethyl-2-(1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-3-yl)oxazole (**20**). To a solution of azaindole-3-carboxylic acid (**8**) (1.00 g, 6.20 mmol) and 2-hydroxy-3-butanone (1.20 g, 2.2 equiv) in DMF (8 mL) was added EDC·HCl (1.78 g, 1.5 equiv) and DMAP (80 mg, 0.1 equiv). The reaction mixture was stirred at rt for 3 d. The reaction mixture was diluted with saturated NaHCO₃ (200 mL) and extracted with EtOAc (3 × 200 mL) and the combined organic layers were washed with brine (200 mL), filtered over anhydrous Na₂SO₄ and dried under reduced pressure. The residue containing **19** (100 mg) was diluted with acidic acid (1 mL) and ammonium acetate was added (100 mg). The reaction was conducted under reflux for 24 h. The crude product was diluted with saturated NaHCO₃ (50 mL) and extracted with EtOAc (3 × 50 mL) and the combined organic layers were washed with brine (200 mL), filtered over anhydrous Na₂SO₄ and dried under reduced pressure. The crude extract was purified by FCC (eluent CHCl₃/MeOH 10:1) to afford **20** as a yellow oil (26 mg, 2%). ¹H NMR (CD₃OD)

8.50–8.40 (m, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.94–7.89 (m, 1H), 7.30–7.22 (m, 1H), 2.36 (s, 3H), 2.14 (s, 3H). LRMS m/z $[M+H]^+$ (TOF ES⁺) 214.0.

4,5-Dimethyl-2-(1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-1H4-pyrrolo[3,2-b]pyridin-3-yl)oxazole (21). Compound **20** (16 mg, 0.08 mmol) and **10** (16 mg, 0.08 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by preparative HPLC to afford **21** as a yellow oil (5 mg, 19%). ¹H NMR (CD₃OD) δ 8.79 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.74–8.70 (m, 2H), 7.94 (s, 1H), 7.85–7.78 (m, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.55 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 5.70 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 2.21 (s, 3H). ¹³C NMR (CD₃OD) δ 154.4, 142.6, 141.1, 137.7, 136.5, 134.4, 134.3, 132.4, 128.7, 127.8, 127.6, 125.7, 122.4, 121.4, 119.0, 117.2, 102.8, 50.5, 39.1, 11.9, 10.4. HRMS m/z $[M+H]^+$ (Q-TOF/ESI) C₂₃H₂₂N₅O calcd: 384.1824 found: 384.1825. LC-MS t_R = 3.01.

N-((1S,2S)-2-Hydroxycyclohexyl)-1H-indazole-3-carboxamide (23a). Indazole-3-carboxylic acid (**22a**) (100 mg, 0.62 mmol) and *trans*-aminocyclohexanol **7a** (86 mg, 0.74 mmol) were reacted according to general procedure A. The crude product was purified by FCC (eluent EtOAc) to afford **23a** as a white solid (106 mg, 66%). ¹H NMR (CD₃OD) δ 8.20 (dt, J = 8.3/0.9 Hz, 1H), 7.54 (dt, J = 8.5/0.9 Hz, 1H), 7.36 (td, J = 8.5/1.1 Hz, 1H), 7.19 (dt, J = 8.0/0.9 Hz, 1H), 3.86–3.80 (m, 1H), 3.57–3.48 (m, 1H), 2.10–2.00 (m, 2H), 1.75–1.65 (m, 2H), 1.45–1.25 (m, 4H). LRMS m/z $[M+H]^+$ (TOF ES⁺) 260.1.

N-((1S,2S)-2-Hydroxycyclohexyl)-1H-indole-3-carboxamide (23b). Indole-3-carboxylic acid (**22b**) (100 mg, 0.62 mmol) and *trans*-aminocyclohexanol **7a** (86 mg, 0.74 mmol) were reacted according to general procedure A. The crude product was purified by FCC (eluent CHCl₃/MeOH 100:2) to afford **23b** as a white solid (55 mg, 34%). ¹H NMR (CD₃OD) δ 8.14–8.08 (m, 1H), 7.95–7.91 (m, 1H), 7.46–7.39 (m, 1H), 7.20–7.12 (m, 2H), 3.85–3.79 (m, 1H), 3.56–3.48 (m, 1H), 2.10–2.02 (m, 2H), 1.79–1.71 (m, 2H), 1.48–1.30 (m, 4H). LRMS m/z $[M+H]^+$ (TOF ES⁺) found: 259.1.

4-Fluoro-N-((1S,2S)-2-hydroxycyclohexyl)-1H-indole-3-carboxamide (23c). 4-Fluoro-1H-indole-3-carboxylic acid (**22c**) (100 mg, 0.62 mmol) and *trans*-2-aminocyclohexanol (**7a**) (86 mg, 0.74 mmol) were reacted according to general procedure A. The crude extract was purified by FCC (eluent CHCl₃/MeOH 100:2) to afford **23c** as a white solid (85 mg, 49%). ¹H NMR (CD₃OD) δ 7.92 (s, 1H), 7.28 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.16 (dd, J = 8.0/5.0 Hz, 1H), 6.89 (dd, J = 13.1/8.0 Hz, 1H), 3.85–3.79 (m, 1H), 3.52–3.44 (m, 1H), 2.20–2.10 (m, 1H),

2.06–1.98 (m, 1H), 1.79–1.71 (m, 2H), 1.48–1.30 (m, 4H). LRMS m/z $[M+H]^+$ (TOF ES⁺) C₁₅H₁₈FN₂O₂ calcd: 277.13; found: 277.1.

4-Chloro-N-((1S,2S)-2-hydroxycyclohexyl)-1H-indole-3-carboxamide (23d). 4-Chloro-1H-indole-3-carboxylic acid (**22d**) (100 mg, 0.62 mmol) and *trans*-2-aminocyclohexanol (**7a**) (86 mg, 0.74 mmol) were reacted according to general procedure A. The crude product was purified by FCC (eluent CHCl₃/MeOH 100:2) to afford **23d** as a white solid (87 mg, 48%). ¹H NMR (CD₃OD) δ 7.72 (s, 1H), 7.37 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 7.14–7.10 (m, 2H), 3.83–3.75 (m, 1H), 3.50–3.44 (m, 1H), 2.18–2.09 (m, 2H), 1.79–1.71 (m, 2H), 1.43–1.28 (m, 4H). LRMS m/z $[M+H]^+$ (TOF ES⁺) 293.1.

N-((1S,2S)-2-Hydroxycyclohexyl)-1H-pyrrole-3-carboxamide (23e). Pyrrole-3-carboxylic acid (**22e**) (69 mg, 0.62 mmol) and *trans*-2-aminocyclohexanol (**7a**) (86 mg, 0.74 mmol) were reacted according to general procedure A. The crude product was purified by FCC (eluent CHCl₃/MeOH 100:2) to afford **23e** as a white solid (56 mg, 43%). ¹H NMR (CD₃OD) δ 7.38 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 6.73 (dd, J = 2.3 Hz, 1H), 6.58 (dd, J = 2.3/1.5 Hz, 1H), 3.76–3.72 (m, 1H), 3.49–3.43 (m, 1H), 2.08–1.96 (m, 2H), 1.75–1.65 (m, 2H), 1.41–1.26 (m, 4H). LRMS m/z $[M+H]^+$ (TOF ES⁺) 209.1.

N-((1S,2S)-2-Hydroxycyclohexyl)-1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-indazole-3-carboxamide (24a). Compound **23a** (50 mg, 0.20 mmol) and **10** (40 mg, 0.20 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent CHCl₃/MeOH 100:1) to afford **24a** as a white solid (60 mg, 73%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.23 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.90 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.82 (d, J = 0.7 Hz, 1H), 7.76 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.45–7.40 (m, 1H), 7.28–7.21 (m, 3H), 5.74 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.71–3.62 (m, 1H), 3.52–3.45 (m, 1H), 1.99–1.87 (m, 2H), 1.69–1.58 (m, 2H), 1.39–1.18 (m, 4H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 162.1, 141.1, 138.5, 136.4, 134.8, 132.6, 128.3, 128.2, 127.2, 125.6, 123.0, 122.8, 122.5, 121.9, 110.9, 71.4, 55.2, 52.6, 39.1, 35.1, 31.7, 25.0, 24.6. HRMS m/z $[M+H]^+$ (Q-TOF/ESI) C₂₅H₂₈N₅O₂ calcd: 430.2246; found: 430.2248. LC-MS t_R = 3.26.

N-((1S,2S)-2-Hydroxycyclohexyl)-1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-indole-3-carboxamide (24b). Compound **23b** (26 mg, 0.10 mmol) and **10** (20 mg, 0.10 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent CHCl₃/MeOH 100:1) to afford **24b** as a white solid (35 mg, 82%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.20–8.16 (m, 2H), 8.07 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.62–7.49 (m, 4H), 7.24 (d, J = 8.2 Hz, 2H),

7.21–7.11 (m, 2H), 5.42 (s, 2H), 4.66 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.72–3.63 (m, 1H), 3.45–3.38 (m, 1H), 1.97–1.88 (m, 2H), 1.70–1.60 (m, 2H), 1.32–1.18 (m, 4H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 164.8, 136.6, 136.5, 135.5, 132.5, 131.4, 128.3, 128.2, 127.3, 125.6, 122.5, 121.9, 121.8, 121.0, 111.2, 111.0, 72.1, 55.0, 49.7, 39.1, 35.0, 32.0, 25.0, 24.6. HRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Q-TOF/ESI) $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_2$ calcd: 429.2291; found: 429.2289. LC-MS $t_R = 3.23$.

4-Fluoro-N-((1S,2S)-2-hydroxycyclohexyl)-1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-indole-3-carboxamide (24c). Compound **23c** (85 mg, 0.30 mmol) and **10** (63 mg, 0.30 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:1) to afford **24c** as a white solid (72 mg, 54%). ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 8.13 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.54–7.48 (m, 3H), 7.42 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.26 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.22–7.15 (m, 1H), 6.99–6.92 (m, 1H), 5.46 (s, 2H), 4.77 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.69–3.62 (m, 1H), 3.46–3.35 (m, 1H), 2.07–1.98 (m, 1H), 1.96–1.87 (m, 1H), 1.72–1.58 (m, 2H), 1.36–1.17 (m, 4H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 163.4, 157.0 (d, $J_{\text{CF}} = 245$ Hz), 139.5 (d, $J_{\text{CF}} = 10.9$ Hz), 136.5, 135.0, 135.2, 132.5, 128.3, 128.2, 125.6, 123.3 (d, $J_{\text{CF}} = 8.1$ Hz), 121.9, 113.7 (d, $J_{\text{CF}} = 19.3$ Hz), 111.0 (d, $J_{\text{CF}} = 2.9$ Hz), 108.2 (d, $J_{\text{CF}} = 2.5$ Hz), 106.8 (d, $J_{\text{CF}} = 21.7$ Hz), 71.9, 55.2, 49.9, 39.1, 34.5, 31.4, 24.5, 24.2. HRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Q-TOF/ESI) $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{FN}_4\text{O}_2$ calcd: 447.2196; found: 447.2201. LC-MS $t_R = 3.29$.

4-Chloro-N-((1S,2S)-2-hydroxycyclohexyl)-1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-indole-3-carboxamide (24d). Compound **23d** (30 mg, 0.10 mmol) and **10** (20 mg, 0.10 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:1) to afford **24d** as a white solid (21 mg, 47%). ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 8.07 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.83 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.53–7.48 (m, 3H), 7.26 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.15–7.11 (m, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.61 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.54–3.66 (m, 1H), 3.40–3.33 (m, 1H), 2.01–1.85 (m, 2H), 1.67–1.58 (m, 2H), 1.30–1.15 (m, 4H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 164.6, 137.5, 136.5, 135.5, 133.3, 132.6, 132.1, 128.4, 128.3, 125.6, 123.5, 123.1, 121.9, 121.6, 113.5, 110.3, 71.8, 55.6, 49.7, 39.1, 34.5, 31.2, 24.6, 24.3. HRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Q-TOF/ESI) $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{ClN}_4\text{O}_2$ calcd: 463.1901; found: 463.1896. LC-MS $t_R = 3.25$.

N-((1S,2S)-2-Hydroxycyclohexyl)-1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)benzyl)-1H-pyrrole-3-carboxamide (24e). Compound **23e** (52 mg, 0.25 mmol) and **10** (51 mg, 0.25 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:1) to afford **24e** as a white solid (51 mg, 54%). ^1H NMR (DMSO- d_6) δ

8.07 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.52 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.40–7.35 (m, 2H), 7.20 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.68 (dd, $J = 2.6/0.8$ Hz, 1H), 6.50 (dd, $J = 2.6/1.6$ Hz, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.57 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.58–3.49 (m, 1H), 3.35–3.29 (m, 1H), 1.90–1.77 (m, 2H), 1.65–1.56 (m, 2H), 1.25–1.14 (m, 4H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 164.3, 136.5, 136.2, 132.5, 128.5, 128.3, 125.6, 123.8, 122.0, 121.9, 120.9, 108.5, 72.1, 54.9, 52.7, 39.1, 35.0, 32.0, 25.0, 24.6. HRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Q-TOF/ESI) $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_2$ calcd: 379.2063; found: 379.2137. LC-MS $t_R = 3.09$.

(4-(1-Methyl-1H-pyrazol-4-yl)phenyl)methanol (27a). A solution of 4-bromobenzyl alcohol (**25**) (1.0 g, 5.30 mmol) and 1-methyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1H-pyrazole (**26a**) (8.00 mmol) in 40 mL degassed THF/1M Na_2CO_3 3:1 was flushed with nitrogen. $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (373 mg, 0.1 equiv) was added and the reaction was stirred under reflux for 6 h. The THF was evaporated under reduced pressure and the mixture was diluted with water (150 mL) and extracted with EtOAc (3 x 150 mL). The combined organic layers were washed with brine (150 mL), filtered over anhydrous Na_2SO_4 and dried under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (eluent $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:1) to afford **27a** as a pale yellow solid (710 mg, 70%). ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.72 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.44 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.35 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 4.67 (s, 2H), 3.92 (s, 3H). LRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (TOF ES^+) 189.1.

(4-(1-Methyl-1H-pyrazol-3-yl)phenyl)methanol (27b). 4-Bromobenzyl alcohol (**25**) (125 mg, 0.60 mmol) and 1-methyl-3-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1H-pyrazole (**26b**) (208 mg, 1.00 mmol) were coupled according to procedures used for the synthesis of compound **10**. The crude product was purified by FCC (eluent $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:1) to afford **27b** as a pale white solid (90 mg, 72%). ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.61 (d, $J = 8.23$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J = 8.23$ Hz, 2H), 6.41 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 4.54 (d, $J = 3.9$ Hz, 2H), 3.79 (s, 3H). LRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (TOF ES^+) 189.1.

3-(4-(Chloromethyl)phenyl)-1-methyl-1H-pyrazole (28b). Benzyl alcohol (**27b**) (90 mg, 0.48 mmol) was reacted according to procedures used for the synthesis of compound **10**. The crude product was purified by FCC (eluent CHCl_3) to afford **28b** as a white solid (93 mg, 95%). ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.75 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.44 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.38 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 4.59 (s, 2H), 3.93 (s, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 136.9, 135.4, 132.9, 129.2, 127.0, 125.8, 122.6, 46.2, 39.1. LRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (TOF ES^+) 207.0.

N-((1S,2S)-2-Hydroxycyclohexyl)-1-(4-(1-methyl-1H-pyrazol-3-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (**29b**). Compound **9a** (28 mg, 0.11 mmol) and **28b** (22 mg, 0.11 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent CHCl₃/MeOH 100:1) to afford **29b** as a white solid (12 mg, 26%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.77 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.49 (dd, *J* = 4.6/1.0 Hz, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.06 (dd, *J* = 8.3/1.0 Hz, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.69 (d, *J* = 2.1, 1H), 7.32 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.27 (dd, *J* = 8.3/4.6 Hz, 1H), 6.63 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 5.53 (s, 2H), 4.81 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.78–3.70 (m, 1H), 3.46–3.37 (m, 1H), 2.06–1.99 (m, 1H), 1.92–1.84 (m, 1H), 1.69–1.58 (m, 2H), 1.37–1.21 (m, 4H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 163.1, 155.7, 149.9, 144.0, 143.2, 136.3, 133.5, 132.8, 129.7, 128.2, 125.7, 119.8, 117.7, 110.7, 103.0, 71.8, 54.0, 50.0, 39.1, 34.4, 31.5, 24.4, 23.8. HRMS *m/z* [M+H]⁺ (Q-TOF/ESI) C₂₅H₂₈N₅O₂ calcd: 430.2243; found: 430.2248. LC-MS *t*_R = 3.04.

N-((1S,2S)-2-Hydroxycyclohexyl)-1-(4-(oxazol-2-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (**29c**). A mixture of **9a** (15 mg, 0.06 mmol) and the substituted benzyl chloride **28c** (15 mg, 0.06 mmol) was reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent CHCl₃/MeOH 100:1) to afford **29c** as a white solid (15 mg, 63%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.75 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.50 (dd, *J* = 4.6/1.0 Hz, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.03 (dd, *J* = 8.3/1.0 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.42 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.35 (s, 1H), 7.26 (dd, *J* = 8.3/4.6 Hz, 1H), 5.62 (s, 2H), 4.80 (br s, 1H), 3.78–3.69 (m, 1H), 3.45–3.38 (m, 1H), 2.07–1.99 (m, 1H), 1.93–1.85 (m, 1H), 1.68–1.60 (m, 2H), 1.39–1.22 (m, 4H). ¹³C NMR (CD₃OD) δ 163.2, 160.9, 144.1, 143.2, 140.6, 139.9, 136.4, 129.8, 129.0, 128.5, 126.9, 126.8, 119.7, 117.8, 110.9, 71.8, 53.9, 49.8, 34.4, 31.5, 24.4, 23.8. HRMS *m/z* [M+H]⁺ (Q-TOF/ESI) C₂₄H₂₅N₄O₃ calcd: 417.1927; found: 417.1923. LC-MS *t*_R = 3.01.

N-((1S,2S)-2-Hydroxycyclohexyl)-1-(4-(thiazol-2-yl)benzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (**29d**). Compound **9a** (15 mg, 0.06 mmol) and the substituted benzyl chloride **28d** (12 mg, 0.06 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent CHCl₃/MeOH 100:1) to afford **29d** as a white solid (20 mg, 80%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.76 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.50 (dd, *J* = 4.6/1.2 Hz, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.05 (dd, *J* = 8.4/1.2 Hz, 1H), 7.93–7.89 (m, 3H), 7.76 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.26 (dd, *J* = 8.4/4.6 Hz, 1H), 5.60 (s, 2H), 4.81 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 3.78–3.70 (m, 1H), 3.46–3.38 (m, 1H), 2.07–1.99 (m, 1H), 1.92–1.85 (m, 1H), 1.69–1.58 (m, 2H), 1.37–1.22 (m, 4H). ¹³C NMR (CD₃OD) δ 167.0, 163.2, 144.3, 144.1, 143.2, 139.5, 136.4, 133.0, 129.7, 128.6, 127.0, 121.0, 119.7, 117.8, 110.9, 71.9, 55.0, 49.8, 34.4, 31.5, 24.4, 23.8.

HRMS m/z $[M+H]^+$ (Q-TOF/ESI) $C_{24}H_{25}N_4O_2S$ calcd: 433.1698; found: 433.1695. LC-MS t_R = 3.07.

1-Benzyl-N-((1S,2S)-2-hydroxycyclohexyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (29e). Compound **9a** (28 mg, 0.11 mmol) and benzyl bromide (**28e**) (13 μ L, 0.11 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent $CHCl_3/MeOH$ 100:1) to afford **29e** as a white solid (31 mg, 83%). 1H NMR ($DMSO-d_6$) δ 8.76 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.50 (dd, J = 4.5/1.3 Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.06 (dd, J = 8.3/1.1 Hz, 1H), 7.35–7.23 (m, 6H), 5.53 (s, 2H), 4.78 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 3.78–3.68 (m, 1H), 3.46–3.37 (m, 1H), 2.06–1.99 (m, 1H), 1.93–1.85 (m, 1H), 1.69–1.58 (m, 2H), 1.38–1.21 (m, 4H). ^{13}C NMR ($DMSO-d_6$) δ 163.2, 144.0, 143.2, 137.5, 136.3, 129.8, 129.2, 128.3, 127.8, 119.7, 117.7, 110.7, 71.8, 53.9, 50.7, 34.4, 31.4, 24.4, 23.8. HRMS m/z $[M+H]^+$ (Q-TOF/ESI) $C_{21}H_{24}N_3O_2$ calcd: 350.1869; found: 350.1872. LC-MS t_R = 2.98.

N-((1S,2S)-2-Hydroxycyclohexyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (29f). Compound **9a** (28 mg, 0.11 mmol) and 4-methoxybenzyl chloride (**28f**) (12 μ L, 0.11 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude product was purified by FCC (eluent $CHCl_3/MeOH$ 100:1) to afford **29f** as a white solid (32 mg, 80%). 1H NMR ($DMSO-d_6$) δ 8.75 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.48 (dd, J = 4.7/1.3 Hz, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.08 (dd, J = 8.4/1.3 Hz, 1H), 7.31–7.22 (m, 3H), 6.89 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 5.43 (s, 2H), 4.79 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 3.78–3.72 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.45–3.37 (m, 1H), 2.06–1.99 (m, 1H), 1.91–1.85 (m, 1H), 1.68–1.57 (m, 2H), 1.36–1.21 (m, 4H). ^{13}C NMR ($DMSO-d_6$) δ 163.2, 159.3, 143.9, 143.2, 136.0, 129.6, 129.5, 129.3, 119.8, 117.6, 114.5, 110.6, 71.9, 55.5, 53.9, 49.7, 34.4, 31.4, 24.4, 23.8. HRMS m/z $[M+H]^+$ (Q-TOF/ESI) $C_{22}H_{26}N_3O_3$ calcd: 380.1974; found: 380.1961. LC-MS t_R = 2.97.

Methyl 4-((3-(((1S,2S)-2-hydroxycyclohexyl)carbamoyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-1-yl)methyl) benzoate (29g). Compound **9a** (28 mg, 0.11 mmol) and methyl 4-(chloromethyl)benzoate (**28g**) (25 mg, 0.11 mmol) were reacted according to general procedure B. The crude was purified by FCC (eluent $CHCl_3/MeOH$ 100:1) to afford **29g** as a white solid (22 mg, 50%). 1H NMR ($DMSO-d_6$) δ 8.78 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.58 (dd, J = 4.6/1.2 Hz, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.00 (dd, J = 8.4/1.2 Hz, 1H), 7.92 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.26 (dd, J = 8.4/4.6 Hz, 1H), 5.64 (s, 2H), 4.79 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.78–3.71 (m, 1H), 3.47–3.39 (m, 1H), 2.06–1.99 (m, 1H), 1.93–1.86 (m, 1H), 1.70–1.59 (m, 2H), 1.37–1.24 (m, 4H). ^{13}C NMR ($DMSO-d_6$) δ 163.2, 163.1, 144.1, 143.1, 142.9, 136.5,

130.1, 129.8, 129.5, 127.9, 119.7, 117.8, 110.9, 71.9, 53.9, 52.6, 49.9, 34.4, 31.4, 24.4, 23.8. HRMS m/z $[M+H]^+$ (Q-TOF/ESI) $C_{23}H_{26}N_3O_4$ calcd: 408.1923; found: 408.1926. LC-MS t_R = 3.04.

4-((3-(((1S,2S)-2-Hydroxycyclohexyl)carbamoyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridin-1-yl)methyl)benzoic acid (29h). A mixture of methyl ester **29g** (33 mg, 0.08 mmol), EtOH/H₂O (1:1) (2 mL) and 1 M NaOH aqueous solution (1 mL) was stirred overnight under reflux. The reaction media was diluted with 1 M HCl solution until pH 3.0, concentrated under reduced pressure and filtered. The crude product was dried and purified by FCC (eluent CHCl₃/MeOH 2:1) to afford **29h** as a white solid (14 mg, 45%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.77 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.50 (dd, J = 4.7/1.2 Hz, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.02 (dd, J = 8.4/1.2 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.33 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.25 (dd, J = 8.4/4.7 Hz, 1H), 5.62 (s, 2H), 4.80 (br s, 1H), 3.77–3.69 (m, 1H), 3.45–3.38 (m, 1H), 2.06–1.99 (m, 1H), 1.93–1.85 (m, 1H), 1.69–1.59 (m, 2H), 1.36–1.22 (m, 4H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 187.9, 163.1, 144.1, 143.1, 141.9, 136.4, 130.2, 130.1, 129.7, 127.6, 119.7, 117.8, 110.9, 71.9, 53.9, 49.9, 34.4, 31.4, 24.4, 23.8. HRMS m/z $[M+H]^+$ (Q-TOF/ESI) $C_{22}H_{24}N_3O_4$ calcd: 394.1767; found: 394.1766. LC-MS t_R = 2.88.

1-(4-Carbamoylbenzyl)-N-((1S,2S)-2-hydroxycyclohexyl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-carboxamide (29i). Methyl ester **29g** (94 mg, 0.23 mmol), methanol (3 mL) and NH₄OH (28% solution, 3 mL) were stirred under reflux for 3 d. The reaction media was concentrated under reduced pressure, diluted with 1 M Na₂CO₃ (80 mL) and extracted with EtOAc (3 \times 80 mL). The combined organic layers were dried under reduced pressure. The crude product was purified by FCC (CHCl₃/MeOH 20:1) to afford **29i** as a white solid (29 mg, 32%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.77 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.50 (dd, J = 4.6/1.2 Hz, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.03 (dd, J = 8.3/1.2 Hz, 1H), 7.92 (br s, 1H), 7.83 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.35–7.31 (m, 3H), 7.27 (dd, J = 8.3/4.6 Hz, 1H), 5.29 (s, 2H), 4.80 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 3.78–3.68 (m, 1H), 3.46–3.39 (m, 1H), 2.06–1.99 (m, 1H), 1.92–1.85 (m, 1H), 1.68–1.58 (m, 2H), 1.37–1.19 (m, 4H). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 168.0, 163.1, 144.1, 143.1, 140.6, 136.4, 134.3, 129.7, 128.4, 127.6, 119.7, 117.8, 110.8, 71.9, 53.9, 49.9, 34.4, 31.4, 24.4, 23.8. HRMS m/z $[M+H]^+$ (Q-TOF/ESI) $C_{22}H_{25}N_4O_3$ calcd: 393.1927; found: 393.1921. LC-MS t_R = 2.79.

Pharmacology. *Whole Cell Radioligand Binding Assays.* FlpIN Chinese hamster ovary (CHO) cells stably expressing the human M₁ mAChR were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 5% fetal bovine

serum (FBS) (ThermoTrace, Melbourne, Australia) and 300 µg/mL G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA). The cells were plated at 50,000 cells per well in 96-well Isoplates (PerkinElmer), and incubated overnight. The following day, cells were washed twice with Phosphate Buffer Saline (PBS), and incubated with varying concentrations of ACh (Sigma, St. Louis, MI) or PAMs or PAMs in the presence of EC₂₀ concentration of ACh, and 0.2 nM [³H]NMS in binding buffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, pH 7.4) for 5 h at room temperature. Non-specific binding was determined using atropine at the final concentration of 100 µM. The assays were terminated by rapid removal of radioligand followed by two 100 µL washes with ice-cold 0.9% NaCl buffer. Radioactivity was determined by addition of 100 µL of Microscint scintillation liquid (PerkinElmer Life Sciences) to each well and counting in a MicroBeta plate reader (PerkinElmer Life Sciences).

IP₁ Accumulation Assays. The IP₁ assay kit (Cisbio) was used for the direct quantitative measurement of myo-inositol 1 phosphate (IP₁). FlpIn CHO cells stably expressing the hM₁ mAChR were seeded at 25,000 per well in 96-well transparent cell culture plates, and incubated overnight. The following day, cells were pre-incubated with IP₁ stimulation buffer (1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 4.2 mM KCl, 146mM NaCl, 5.5mM D-Glucose, 10 mM HEPES and 50 mM LiCl, pH 7.4) for 1 h at 37 °C, 5% CO₂. Cells were then incubated with varying concentration of ACh and the PAMs for 1 h at 37 °C, 5% CO₂. The reactions were terminated by removal of the stimulation buffer and addition of 50 µL of lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.0, 15 mM KF, 1.5% V/V Triton-X-100, 3% V/V FBS, 0.2% W/V BSA). Seven µL of cell lysates were transferred to wells of 384-well Proxy-plates (PerkinElmer), and IP₁ levels were measured by incubating the lysates with 1.5 µL of the anti-IP₁ Tb cryptate conjugate and 1.5 µL of the IP₁-D2 conjugate for 1 h at 37 °C. The emission signals were measured at 620 and 665 nm after excitation at 340 nm using an Envision multilabel plate reader (PerkinElmer). The signal was expressed as the HTRF ratio: [(fluorescence 665 nm/fluorescence 620 nm) × 10⁴], interpolated from the standard curve, and normalized to the maximum response to ACh.

Data Analysis. All data were analyzed using Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA). Binding interaction studies with allosteric ligands were fitted to the following allosteric ternary complex model (eq. 1) (MAY et al., 2007b)

$$Y = \frac{B_{\max}[A]}{[A] + \left[\frac{K_A K_B}{\alpha' [B] + K_B} \right] \left[1 + \frac{[I]}{K_I} + \frac{[B]}{K_B} + \frac{\alpha [I][B]}{K_I K_B} \right]} \quad (1)$$

where B_{\max} is the total number of receptors, $[A]$, $[B]$ and $[I]$ denote the concentrations of radioligand, allosteric modulator, and orthosteric ligand, respectively; K_A , K_B and K_I are their respective equilibrium dissociation constants. α' and α are the cooperativities between the allosteric ligand and radioligand or the allosteric modulator and orthosteric ligand, respectively. Values of α or $\alpha' > 1$ denote positive cooperativity, values < 1 but > 0 denote negative cooperativity, and a value of 1 indicates neutral cooperativity. α' values were determined from interaction studies between radioligand and allosteric modulator in absence of the orthosteric agonist (i.e., $[I] = 0$).

Functional interaction studies between orthosteric agonists and allosteric modulators in IP_1 assays were analysed according to a three-parameter logistic equation or the following operational model of allosterism and agonism (eq. 2) (AURELIO et al., 2009; LEACH; SEXTON; CHRISTOPOULOS, 2007)

$$E = \text{Basal} + \frac{(E_m - \text{Basal}) ([A](K_B + \alpha\beta[B]) + \tau_B[B]EC_{50})^n}{EC_{50}^n(K_B + [B])^n + ([A](K_B + \alpha\beta[B]) + \tau_B[B]EC_{50})^n} \quad (2)$$

where E_m is the maximal possible system response, and Basal is the response in the absence of agonist. $[A]$ and $[B]$ are concentrations of orthosteric and allosteric ligands, respectively. K_B is the equilibrium dissociation constant of allosteric ligand, and EC_{50} is the concentration of orthosteric agonist required to achieve half maximal response. α and β represent the magnitude of the allosteric effects on orthosteric ligand affinity and efficacy, respectively; τ_B is the efficacy of allosteric ligand, and n is the slope factor of the transducer function that links occupancy to response. The application of this simplified equation is only valid if the orthosteric agonist is a full agonist both in the absence and presence of all concentrations of modulator (AURELIO et al., 2009), which was the case in all studies conducted herein.

All potency, affinity, efficacy, and cooperativity values were estimated as logarithms (CHRISTOPOULOS, 1998), and unpaired t-test or one-way analysis of variance with a Dunnett's multiple comparison post test was used to determine statistical differences, where appropriate. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

■ ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by Discovery grant DP110100687 of the Australian Research Council as well as Program grant APP1055134 of the National Health and Medicinal Research Council (NHMRC) of Australia. A.C. is a Senior Principal Research Fellow of the NHMRC. J. C. C.D. thanks the scholarship from CNPq.

■ ABBREVIATIONS USED

ACh, acetylcholine; AD, Alzheimer's disease; AE, adverse effects; Boc, tertbutoxycarbonyl; DCM, dichloromethane; DMF, dimethylformamide; equiv, equivalent; EtOAc, ethyl acetate; FCC, flash column chromatography; M₁ mAChR, M₁ muscarinic acetylcholine receptor; PAM, positive allosteric modulator; TFA, trifluoroacetic acid.

CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A obtenção de moléculas capazes de interagir com receptores acoplados à proteína G foi abordada com diferentes enfoques, incluindo tópicos de diversas áreas, dentre elas, a análise computacional por experimentos de atracamento, predição da biodisponibilidade dos possíveis compostos bioativos, síntese e otimização de rotas sintéticas e procedimentos de purificação, caracterização espectral de compostos inéditos e avaliação farmacológica. Essa ampla gama de conteúdos, proporcionou avanços nos estudos de química medicinal, especialmente com progresso no planejamento de ligantes ortostéricos dos receptores muscarínicos (análogos muscarínicos) a partir de galactanas e no desenvolvimento e elucidação da relação estrutura-atividade de ligantes alostéricos positivos dos receptores muscarínicos do subtipo M₁.

Os experimentos de atracamento molecular permitiram a avaliação de características dos ligantes para a interação com os GPCRs, dentre elas a conformação e substituintes do anel tetra-hidrofurano e grau de substituição no nitrogênio exocíclico. O composto construído a partir do bloco estrutural 3,6-AnGal presente na estrutura nativa da agarabiose (**L01**, enantiômero-L) demonstrou ser mais promissor para a interação com o receptor M₃-muscarínico. Por outro lado, o derivado do enantiômero-D do anel 3,6-AnGal (**D01**, proveniente da *k*-carragenana) apresentou menor ΔG^* na interação com o alvo, sugerindo a formação de complexo receptor-ligante menos estável. A presença de ambos os grupos hidroxila, em C4 e C5 do composto **L01**, provavelmente foram capazes de reforçar interações por ligação de hidrogênio com o aminoácido Asn507 no sítio ativo dos M₃ mAChRs. O derivado **L01** apresentou complexo de interação com o M₃ mAChR mais estável (menor ΔG^*) que o observado para molécula de referência, (+)-muscarina.

Foi possível identificar também outros cinco compostos promissores (**L13**, **L15**, **L16**, **L17** e **L21**), dentre as 26 moléculas hipotéticas propostas, nessa fase do estudo (quatro para interação com os receptores muscarínicos – **L01**, **L13**, **L16** e **L17**; três para interação com receptores histaminérgicos – **L13**, **L17** e **L21** e uma para interação com receptor adrenérgico – **L15**). Através desse estudo, foi possível demonstrar a versatilidade do material de partida empregado. O bloco estrutural 3,6-AnGal apresentou-se como uma estrutura versátil para elaboração de diferentes derivados com potencial terapêutico e afinidades específicas para diferentes tipos de GPCR. A análise teórica das propriedades físicoquímicas destes compostos sugeriu a viabilidade dessas moléculas como fármacos (*druglikeness*), mesmo com algumas ressalvas quanto à possibilidade de baixa biodisponibilidade para algumas moléculas dessa série. Nem todas as moléculas consideradas promissoras nos estudos *in silico* puderam ser sintetizadas, porém sugere-se que tal análise preliminar possa servir de base para trabalhos futuros.

Alguns compostos glicídicos *N*-benzil-glicamínicos **L24**, **L25** e **L26**, planejados para interação com o sítio alostérico do receptor muscarínico do subtipo M₁, foram sintetizados e testados *in vitro*, porém não foi observada a atividade modulatória desejada para esses derivados nas concentrações usuais. Alternativamente, foi elaborado um composto híbrido azaindol-carboidrato **6f**, o qual exibiu atividade modulatória satisfatória, comparável com a molécula de referência, BQCA. Esse composto apresentou maior polaridade quando comparado aos demais compostos da série de arilpirróis e por isso é pouco provável que seja capaz de permear a barreira hematoencefálica. Isso representa uma oportunidade para o estudo dessa classe de composto para modulação dos receptores M₁ presentes nas células parietais do estômago ou mesmo para estudo dos efeitos colinérgicos observados para esses derivados.

No que diz respeito à síntese, foi estabelecida uma técnica para o aproveitamento da unidade 3,6-AnGal na obtenção de derivados C-glicosídeos contendo um nitrogênio exocíclico. Foram sintetizados 19 compostos ao todo, sendo 13 inéditos (8 glicaminas e 5 sais quaternários de amônio). A metodologia de síntese envolveu rotas curtas, sem a necessidade de proteção dos grupos hidroxila e foi, em grande parte, realizada em meio aquoso. O presente estudo também se dedicou a explorar e relatar alternativas para superar as dificuldades encontradas nas reações e nos procedimentos de purificação dos compostos de interesse. Através de reações de hidrólise seguidas de reações de aminação reductiva e purificação com resinas de troca iônica e cromatografia em sílica, foram obtidos seis intermediários-chave (1-metil-1-desoxiglicaminas **3**, **7**, **8**, **9**, **13** e **15**) a partir da agarose e da *k*-caragenana. Esses compostos foram utilizados nesse trabalho para síntese dos derivados **L01** e **D01**, mas podem também ser empregados para obtenção de outros compostos de bioativos. O nitrogênio secundário em suas estruturas pode ser reativo em diversas situações, dentre elas nas reações de *N*-alquilação (formação de aminas terciárias) e *N*-acilação (com a formação de amidas), tornando fácil o uso destas estruturas para construção de moléculas de interesse terapêutico e tecnológico.

Esse trabalho incluiu também o planejamento, síntese e avaliação farmacológica de moduladores alostéricos positivos dos receptores muscarínicos M₁ a partir de blocos estruturais arilpirrólicos. Foram sintetizados 126 compostos ao todo, sendo 52 derivados arilpirrólicos inéditos e ainda foram testados *in vitro* 41 compostos empregando-se a quantificação de IP₁ em células-CHO expressando o receptor M₁-muscarínico humano. Através dessa metodologia pôde-se identificar compostos com diferentes perfis de atividade. Alguns ativaram o receptor de maneira potente mesmo na ausência de ACh (ligante ortostérico); outros apenas potencializaram a ação do neurotransmissor sem apresentar atividade intrínseca e vários deles apresentaram ambas as atividades. Para evitar os efeitos adversos relacionados à toxicidade colinérgica, os compostos com maior poder modulatório

e menor atividade intrínseca foram considerados mais adequados como candidatos a farmacos, uma vez que exercem sua função no momento e local onde o estímulo endógeno está presente.

A molécula **6f** é um híbrido azaindol-carboidrato que foi sintetizado nesse trabalho. Esse composto representa a colaboração entre o grupo de pesquisa brasileiro SinHeGli e o grupo de pesquisa australiano da *Monash University*. Ele apresentou atividade similar à molécula de referência BQCA e propriedades físico-químicas únicas, que permitirão a avaliação dos efeitos periféricos de PAMs dos receptores M₁ dessa família de composto em outros estudos.

Cinco derivados promissores dessa série (**6o**, **15b**, **15d**, **24e** e **29h**) foram submetidos também a ensaios farmacológicos mais detalhados, dentre os quais foram traçadas as curvas de concentração-resposta e realizados ensaio de afinidade empregando-se a competição com radioligante. Estes ensaios permitiram elucidar diferentes parâmetros da atividade alostérica (cooperatividade de ligação e eficácia da ACh e eficácia intrínseca) e proporcionaram informações relevantes sobre a relação estrutura-atividade de tais substâncias. O derivado **15d** foi capaz de potencializar a ação da ACh em cerca de 50 vezes (eficácia similar ao BQCA – substância referência) apresentando apenas um terço da atividade intrínseca quando comparado à molécula de referência. A minuciosa avaliação do perfil farmacológico dos compostos dessa série permitiu avaliar nuances da atividade modulatória de tais compostos. Esse conhecimento foi especialmente relevante para melhorar a compreensão das respostas *in vivo* observadas para essa classe de compostos, bem como para contribuir no desenvolvimento de moléculas mais adequadas para o tratamento dos sintomas observados em pacientes acometidos pela doença de Alzheimer.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-RIDHA, A. et al. Mechanistic insights into allosteric structure-function relationships at the M1 muscarinic acetylcholine receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 48, p. 33701–33711, 2014a.
- ABDUL-RIDHA, A. et al. Molecular determinants of allosteric modulation at the M1 muscarinic acetylcholine receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 9, p. 6067–79, 2014b.
- ALLEN, M. et al. Association of MAPT haplotypes with Alzheimer's disease risk and MAPT brain gene expression levels. **Alzheimer's Research and Therapy**, v. 6, n. 4, p. 39–53, 2014.
- ALT, A. et al. Evidence for classical cholinergic toxicity associated with selective activation of M1 muscarinic receptors. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 356, p. 293–304, 2016.
- ASPINALL, G. O. **The Polysaccharides**. 2ed. New York: Academic Press, 1982.
- AURELIO, L. et al. Allosteric modulators of the adenosine A1 receptor: synthesis and pharmacological evaluation of 4-substituted 2-amino-3-benzoylthiophenes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, p. 4543–4547, 2009.
- AVLANI, V. A. et al. Critical role for the second extracellular loop in the binding of both orthosteric and allosteric G protein-coupled receptor ligands. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 25677–25686, 2007.
- BALLARD, T. M. et al. Indol and Indazol derivatives. **WO 2015/044072**, 2015a.
- BALLARD, T. M. et al. Pyrrolopyridine or pyroazolepyridine derivatives. **WO2015/028483**, 2015b.
- BAXTER, E. W.; REITZ, A. B. Reductive aminations of carbonyl compounds with borohydride and borane reducing agents. In: **Organic Reactions**. Wiley, 2004.
- BOCHKOV, A. F.; ZAIKOV, G. E. **Chemistry of the O-glycosidic bond: formation and cleavage**. Moscou: Pergamon Press, 1979.
- BRUECKNER, F. et al. Structure of beta-adrenergic receptors. **Methods in Enzymology**, v. 520, p. 117–147, 2013.
- BUCHEN, L. It's all about the structure. **Nature**, v. 476, p. 387–390, 2011.
- CANALS, M. et al. A Monod-Wyman-Changeux mechanism can explain G protein-coupled receptor (GPCR) allosteric modulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 1, p. 650–659, 2012.
- CAULFIELD, M. P.; BIRDSALL, N. J. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 50, p. 279–290, 1998.
- CHEN, H. M.; ZHENG, L.; YAN, X. J. The preparation and bioactivity research of agaro-oligosaccharides. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, n. 1, p. 29–36, 2005.
- CHEREZOV, V. et al. High-Resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic. **Science**, v. 318, p. 1258–1266, 2007.
- CHIVERO, P. et al. Effect of xanthan and guar gums on the formation and stability of soy soluble polysaccharide oil-in-water emulsions. **Food Research International**, v. 70, p. 7–14, 2015.
- CHRISTOPOULOS, A. Assessing the distribution of parameters in models of ligand–receptor interaction: to log or not to log. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 9, p. 351–357, 1998.

CHRISTOPOULOS, A. et al. International union of basic and clinical pharmacology. XC. Multisite pharmacology: recommendations for the nomenclature of receptor allosterism and allosteric ligands. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 4, p. 918–947, 2014.

CHRISTOPOULOS, A. Advances in G protein-coupled receptor allostery: from function to structure. **Molecular Pharmacology**, v. 86, n. 5, p. 463–478, 2014.

CLADER, J. W.; WANG, Y. Muscarinic receptor agonists and antagonists in the treatment of Alzheimer's disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, p. 3353–3361, 2005.

CONN, P. J.; CHRISTOPOULOS, A.; LINDSLEY, C. W. Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, p. 41–54, 2009.

COSENZA, V. A.; NAVARRO, D. A.; STORTZ, C. A. Usage of alpha-picoline borane for the reductive amination of carbohydrates. **Arkivoc**, v. 2011, p. 182–194, 2011.

CRIADO, P. R. et al. Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: novos conceitos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 2, p. 195–210, 2010.

CURA, A. J.; CARRUTHERS, A. The role of monosaccharide transport proteins in carbohydrate assimilation, distribution, metabolism and homeostasis. **Compr Physiol.**, v. 2, n. 2, p. 863–914, 2013.

DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME : a free web tool to evaluate pharmacokinetics, druglikeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–13, 2017.

DAINA, A.; ZOETE, V. A BOILED-Egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. **ChemMedChem**, v. 11, p. 1117–1121, 2016.

DALLAGNOL, J. C. C. et al. Aqueous semisynthesis of C-glycoside glycamines from agarose. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 13, p. 1222–1229, 2017.

DANGERFIELD, E. M. et al. Protecting-group-free synthesis of amines: synthesis of primary amines from aldehydes via reductive amination. **Journal of Organic Chemistry**, v. 75, n. 16, p. 5470–5477, 2010.

DAVIE, B. J. et al. Synthesis and pharmacological evaluation of analogues of benzyl quinolone carboxylic acid (BQCA) designed to bind irreversibly to an allosteric site of the M1 muscarinic acetylcholine receptor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 5405–5418, 2014.

DAVIE, B. J.; CHRISTOPOULOS, A.; SCAMMELLS, P. J. Development of M1 mAChR allosteric and bitopic ligands: prospective therapeutics for the treatment of cognitive deficits. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 4, p. 1026–1048, 2013.

DAVIS, A. A. et al. Deletion of M1 muscarinic acetylcholine receptors increases amyloid pathology in vitro and in vivo. **Journal of Neurosciences**, v. 30, n. 12, p. 4190–4196, 2010.

DAVOREN, J. E. et al. Design and optimization of selective azaindole amide M1 positive allosteric modulators. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 2, p. 650–655, 2016a.

DAVOREN, J. E. et al. Discovery of the potent and selective M1 PAM-agonist N-[(3R,4S)-3-hydroxytetrahydro-2H-pyran-4-yl]-5-methyl-4-[4-(1,3-thiazol-4-yl)benzyl]pyridine-2-carboxamide (PF-06767832): evaluation of efficacy and cholinergic side effects. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, p. 6313–6328, 2016b.

DAVOREN, J. E. et al. Design and synthesis of γ - and δ -lactam M1 positive allosteric modulators (PAMs): convulsion and cholinergic toxicity of an M1-selective PAM with weak agonist activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 15, p. 6649–6663, 2017.

DE AMICI, M. et al. Synthesis and pharmacological investigation of cholinergic ligands structurally related to muscarone. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 171–177, 1989.

DE ARAÚJO, C. A. et al. Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 483–491, 2013.

DE MAGALHÃES, C. S. et al. A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands. **Information Sciences**, v. 289, 2014.

DECKER, M.; HOLZGRABE, U. M1 muscarinic acetylcholine receptor allosteric modulators as potential therapeutic opportunities for treating Alzheimer's disease. **Medicinal Chemistry Communications**, v. 3, p. 752–762, 2012.

DELATTRE, C.; FENORADOSOA, T. A.; MICHAUD, P. Galactans: an overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, p. 1075–1092, 2011.

DIXON, R. A. et al. Cloning of the gene and cDNA for mammalian bold italic beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. **Nature**, v. 321, p. 75–79, 1986.

DORSAM, R. T.; GUTKIND, J. S. G-protein-coupled receptors and cancer. **Nature reviews**, v. 7, p. 79–94, 2007.

DROR, R. O. et al. Structural basis for modulation of a G-protein-coupled receptor by allosteric drugs. **Nature**, v. 503, p. 295–299, 2013.

DUCATTI, D. R. B. et al. Production of carbohydrate building blocks from red seaweed polysaccharides . Efficient conversion of galactans into C-glycosyl aldehydes. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 1, p. 576–588, 2009.

DUCATTI, D. R. B. et al. Production of oligosaccharides by partial acid hydrolysis of galactans. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 2, p. 296–304, 2011.

EGLIN, R. M. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. **Autonomic and Autacoid Pharmacology**, v. 26, p. 219–233, 2006.

ESPINOZA-FONSECA, L. M.; TRUJILLO-FERRARA, J. G. Identification of multiple allosteric sites on the M1 muscarinic acetylcholine receptor. **FEBS Letters**, v. 579, p. 6726–6732, 2005.

FERREIRA, L. G. et al. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v. 20, p. 13384–13421, 2015.

FISHER, A. Cholinergic treatments with emphasis on M1 muscarinic agonists as potential disease-modifying agents of Alzheimer's disease. **The American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 5, p. 433–442, 2008.

GFELLER, D.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. Shaping the interaction landscape of bioactive molecules. **Bioinformatics**, v. 29, n. 23, p. 3073–3079, 2017.

GHONEIM, O. M. et al. Novel ligands for the human histamine H 1 receptor : synthesis, pharmacology and comparative molecular field analysis studies of 2-dimethylamino-5-(6)-phenyl-1,2,3,4-tetrahydrophthalenes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 6640–6658, 2006.

GONÇALVES, A. G. et al. Semisynthesis of long-chain alkyl ether derivatives of sulfated oligosaccharides via dibutylstannylene acetal intermediates. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 72, n. 26, p. 9896–904, 21 dez. 2007.

GONÇALVES, A. G. et al. Chemistry and biotechnology of phycocolloids. In: FONTANA, J. D.; TIBONI, M.; GRZYBOWSKI, A. **Cellulose and Other Naturally Occurring Polymers**. 1ed. Kerala: Org, 2014. p. 41–47.

GOYAL, R. K. Muscarinic receptors subtypes: physiology and clinical implications. **New England Journal of Medicine**, v. 321, p. 1022–1029, 1989.

GREENE, T. W.; WUTS, P.G.M. **Protective groups in organic synthesis**. 3ed. New York: Wiley and Sons Inc, 1999.

GREENLEE, W. et al. Muscarinic agonists and antagonists in the treatment of Alzheimer's disease. **IL Farmaco**, v. 56, p. 247–250, 2001.

GRUNER, S. A. W. et al. Carbohydrate-based mimetics in drug design: Sugar amino acids and carbohydrate scaffolds. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 491–514, 2002.

GUEDES, I. A.; MAGALHÃES, C. S.; DARDENE, L. E. Atracamento molecular. In: VERLI, H. **Bioinformática - da biologia à flexibilidade molecular**. 1ed. Porto Alegre: Academic Press, 2014. p. 189–208.

GUILLARME, S. et al. Synthesis and glycosidase inhibitory activity of 1-amino-3,6-anhydro-1-deoxy-d-sorbitol derivatives. **Bioorganic Chemistry**, v. 38, n. 2, p. 43–47, 2010.

HAASNOOT, C. A. G.; DE LEEUW, F. A. A. M.; ALTONA, C. The relationship between proton-proton NMR coupling constants and substituent electronegativities. **Tetrahedron**, v. 36, n. 3, p. 2783–2792, 1980.

HAGA, K. et al. Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. **Nature**, v. 482, n. 7386, p. 547–551, 2012.

HAUSER, A. S. et al. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, p. 829–842, 2017.

HISAHARA, S.; SHIMOHAMA, S. Dopamine receptors and Parkinson's disease. **International Journal of Medicinal Chemistry**, v. 2011, p. 1–16, 2011.

HOLDEN, M.; KELLY, C. Use of cholinesterase inhibitors in dementia. **Advances in Psychiatric Treatment**, v. 8, n. 2, p. 89–96, 2002.

HULME, E. C.; BIRDSALL, N. J. M.; BUCKEY, N. J. Muscarinic receptor subtypes. **Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology**, v. 30, p. 633–673, 1990.

JIANG, S. et al. M1 muscarinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. **Neuroscience Bulletin**, v. 30, p. 295–307, 2014.

KADAM, V. S.; SHAIKH, S. G.; PATEL, A. L. A series of 2, 4, 5-trisubstituted oxazole: synthesis, characterization and DFT modelling. **Journal of Molecular Structure**, v. 1114, p. 181–188, 2016.

KATRITCH, V.; CHEREZOV, V.; STEVENS, R. C. Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. **Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology**, v. 53, p. 531–556, 2013.

KINNAMON, S. C. Taste receptor signaling - from tongues to lungs. **Acta Physiol**, v. 204, n. 2, p. 158–168, 2012.

KOELLER, K. M.; WONG, C. H. Emerging themes in medicinal glycoscience. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 835–841, 2000.

KOPPEN, C. J. VAN; JAKOBS, K. H. Arrestin-independent internalization of G protein-coupled receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 66, n. 3, p. 365–367, 2004.

KRUSE, A. C. et al. Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. **Nature**, v. 482, p. 552–556, 2012.

KRUSE, A. C. et al. Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. **Nature**, v. 504, p. 101–119, 2013.

KRUSE, A. C. et al. Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 13, n. 7, p. 549–60, 2014.

KUDUK, S. D. et al. Benzoquinazolinone derivatives as M1 receptor positive allosteric modulators and their preparation, pharmaceutical compositions and use in the treatment of diseases. **WO 2010/059773**, 2010.

LAROCK, R. C. **Comprehensive organic transformations: a guide to functional group preparation**. 2ed. New York: John Wiley and Sons Inc, 1999.

LAURIENZO, P. Marine polysaccharides in pharmaceutical applications : an overview. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2435–2465, 2010.

LE, G. T. et al. Molecular diversity through sugar scaffolds.pdf. **Drug Discovery Today**, v. 8, p. 701–709, 2003.

LEACH, K.; SEXTON, P. M.; CHRISTOPOULOS, A. Allosteric GPCR modulators: taking advantage of permissive receptor pharmacology. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 28, n. 8, p. 382–389, 2007.

LEFKOWITZ, R. J. The superfamily of heptahelical receptors. **Nature cell biology**, v. 2, p. E133–E136, 2000.

LI, Y. et al. Micellization of lactosylammonium surfactants with different counter ions and their interaction with DNA. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 443, p. 224–232, 2014.

LIN, Y. et al. Design , synthesis and biological activity evaluation of desloratadine analogues as H1 receptor antagonists. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 14, p. 4178–4185, 2013.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 3–26, 2001.

LOEWI, O. Über humorale übertragbarkeit der Herznervenwirkung. **Pflugers Arch**, v. 189, p. 239–242, 1921.

MA, L. et al. Selective activation of the M1 muscarinic acetylcholine receptor achieved by allosteric potentiation. **Proc Natl Acad Sci**, v. 106, n. 42, p. 15950–15955, 2009.

MANTEL, S. J. et al. 3R-Hydroxymuscarine from L-rhamnose without protection. **Tetrahedron Letters**, v. 33, n. 31, p. 4503–4506, 1992.

MANTEL, S. J. et al. 3-Hydroxymuscarines form L-rhamnose. **Tetrahedron**, v. 49, n. 16, p. 3343–3358, 1993.

MARTINS, A. F. et al. Antimicrobial activity of chitosan derivatives containing N-quaternized moieties in its backbone : a review. **Inter. Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 20800–20832, 2014.

MAY, L. T. et al. Structure-function studies of allosteric agonism at M2 muscarinic acetylcholine receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 72, n. 2, p. 463–476, 2007a.

MAY, L. T. et al. Allosteric modulation of G protein–coupled receptors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 47, p. 1–51, 2007b.

MEDEIROS, R. et al. Loss of muscarinic M1 receptor exacerbates Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. **American Journal of Pathology**, v. 179, n. 2, p. 980–991, 2011.

MISIAK, P. et al. New gluconamide-type cationic surfactants: Interactions with DNA and lipid membranes. **Biophysical Chemistry**, v. 180–181, p. 44–54, 2013.

MISTRY, S. N. et al. Synthesis and pharmacological profiling of analogues of benzyl quinolone carboxylic acid (BQCA) as allosteric modulators of the M1 muscarinic receptor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, p. 5151–5172, 2013.

MISTRY, S. N. et al. 4-Phenylpyridin-2-one derivatives: a novel class of positive allosteric modulator of the M1 muscarinic acetylcholine receptor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, p. 389–409, 2015.

MISTRY, S. N. et al. Novel fused arylpyrimidinone based allosteric modulators of the M1 muscarinic acetylcholine receptor. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 7, p. 647–661, 2016.

- MUFSON, E. J. et al. Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implications. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 8, n. 11, p. 1703–1718, 2009.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Biossinalização. In: **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4ed. São Paulo: Sarvier, 2005. p. 432–448.
- ORSATO, A. **Síntese de alquilaminoglicosídeos sulfatados para o desenvolvimento de compotos com atividade antiviral**. [s.l.] UFPR, 2007.
- PAJOUHESH, H.; LENZ, G. R. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. **The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 2, p. 541–553, 2005.
- PALCZEWSKI, K. et al. Crystal structure of rhodopsin : a G protein-coupled receptor. **Science**, v. 289, p. 739–745, 2000.
- PANIGRAHI, S. K.; DESIRAJU, G. R. Strong and weak hydrogen bonds in the protein–ligand interface. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 67, p. 128–141, 2007.
- PATEL, S. Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds: updating the recent findings. **3 Biotech**, v. 2, p. 171–185, 2012.
- PAYNE, A. et al. 4-azaindole derivatives. **US 2015/0094328**, 2015.
- PERSIN, Z. et al. Challenges and opportunities in polysaccharides research and technology: The EPNOE views for the next decade in the areas of materials, food and health care. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 22–32, 2011.
- POPSAVIN, V. et al. Divergent synthesis of two novel muscarine analogues from D-glucose. **Tetrahedron**, v. 40, p. 9305–9308, 1999.
- POPSAVIN, V. et al. A divergent synthesis of (+)-muscarine and (+)-epi-muscarine from d-glucose. **Tetrahedron**, v. 56, p. 5929–5940, 2000.
- POTTER, P. E. Investigational medications for treatment of patients with Alzheimer's disease. **The Journal of the American Osteopathic Association**, v. 110, p. S27-36, 2010.
- PRINCE, M. et al. World Alzheimer report 2015. **Alzheimer's Disease International**, 2015.
- RANG, H. P. et al. Como agem os fármacos: aspectos moleculares. In: **Rang & Dale Farmacologia**. 6ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008a. p. 33–42.
- RANG, H. P. et al. Transmissão noradrenérgica. In: **Rang & Dale Farmacologia**. 6ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008b. p. 168–174.
- RANG, H. P. et al. Transmissão colinérgica. In: **Rang & Dale Farmacologia**. 6ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008c. p. 144–167.
- RASMUSSEN, S. G. F. et al. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. **Nature**, v. 450, p. 383–387, 2007.
- RENN, D. Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: status, needs and prospects. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 9–14, 1997.
- RODRÍGUEZ, D. et al. Molecular docking screening using agonist-bound GPCR structures: probing the A2-adenosine receptor. **Journal of Chemical Information and Modeling**, p. 150213091931009, 2015.
- RODRÍGUEZ, D.; RANGANATHAN, A.; CARLSSON, J. Strategies for improved modeling of GPCR-drug complexes: blind predictions of serotonin receptors bound to ergotamine. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, p. 2004–2021, 2014.

- ROOK, J. M. et al. Diverse effects on M1 signaling and adverse effect liability within a series of M1 ago-PAMs. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 8, p. 866–883, 2017.
- SCHNEIDER, G.; BÖHM, H.-J. Virtual screening and fast automated docking methods. **Drug discovery today**, v. 7, n. 1, p. 64–70, 2002.
- SEEBERGER, P. H.; WERZ, D. B. Synthesis and medical applications of oligosaccharides. **Nature**, v. 446, p. 1046–1051, 2007.
- SHIMAMURA, T. et al. Structure of the histamine H1 receptor complex with doxepin. **Nature**, v. 475, n. 7354, p. 65–70, 2012.
- SHONBERG, J. et al. GPCR crystal structures: medicinal chemistry in the pocket. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 14, p. 3880–3906, 2015.
- SHUKLA, R. K.; TIWARI, A. Carbohydrate molecules: an expanding horizon in drug delivery and biomedicine. **Critical reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 28, n. 3, p. 255–92, 2011.
- SLIWOSKI, G. et al. Computational methods in drug discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 66, p. 334–395, 2014.
- SPEHR, M.; MUNGER, S. D. Olfactory receptors: G protein-coupled receptors and beyond. **Journal of Neurochemistry**, v. 109, p. 1570–1583, 2009.
- STILL, W. C.; KAHN, M.; MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 43, n. 11, p. 2923–2925, 1978.
- SUBBARAO, A. **GPCR: Structure-Function relationship**. Disponível em: <<http://www.doctorshangout.com/profiles/gpcr-structure-function>>. Acesso em: 6 fev. 2015.
- TANASOVA, M.; FEDIE, J. R. Molecular tools for facilitative carbohydrate transporters (Gluts). **ChemBioChem**, v. 18, n. 18, p. 1774–1788, 2017.
- THAL, D. M. et al. Crystal structures of the M1 and M4 muscarinic acetylcholine receptors. **Nature**, v. 531, n. 7594, p. 335–40, 2016.
- USOV, A. I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. **Food Hydrocolloids**, v. 12, p. 301–308, 1998.
- VALANT, C. et al. A novel mechanism of G protein-coupled receptor functional selectivity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 43, p. 29312–29321, 2008.
- VERDONK, M. L. et al. Improved protein–ligand docking using GOLD. **PROTEINS: Structure, Function, and Genetics**, v. 52, p. 609–623, 2003.
- WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. 1ed. New York: Academic Press, 1963.
- YEATMAN, H. R. et al. Allosteric modulation of M1 muscarinic acetylcholine receptor internalization and subcellular trafficking. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, p. 15856–66, 2014.
- YONA, S. et al. Adhesion-GPCRs: emerging roles for novel receptors. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 33, p. 491–500, 2008.
- YUN, E. J. et al. Enzymatic production of 3,6-anhydro-L-galactose from agarose and its purification and in vitro skin whitening and anti-inflammatory activities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 2961–2970, 2013.
- ZHENG, M. et al. Palladium-catalyzed sequential C-N/C-O bond formations: synthesis of oxazole derivatives from amides and ketones. **Organic Letters**, v. 16, n. 22, p. 5906–5909, 2014.

ANEXOS

Anexo 1: Passo a passo dos experimentos de atracamento

A – Instalação dos Programas

a) ChemSketch

- Acesse: <http://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/>
- Clique em “Download Free Version” abra o arquivo .exe e siga as instruções

b) Avogadro

- Acesse: <https://avogadro.cc/>
- Clique em “Download” abra o arquivo .exe e siga as instruções

c) AutoDock Tools

- Acesse: <http://mgltools.scripps.edu/downloads>
- Baixe o arquivo .exe, versão para Windows (ou a versão correspondente à sua máquina)
- Siga as instruções de instalação



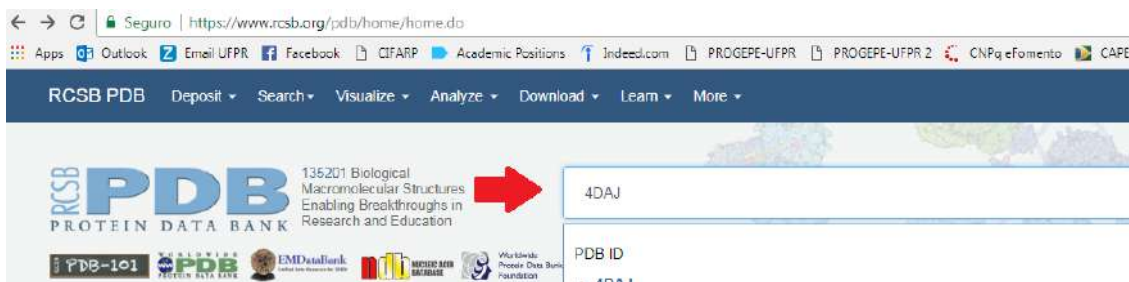
d) PyMOL

- Acesse: <https://pymol.org/2/>
- Clique em “Buy License”; depois clique em “Student/Teacher” para adquirir versão gratuita.
- Faça seu cadastro: você receberá um link para download no seu e-mail
- Siga as instruções para instalação

B – Estrutura do Receptor

a) baixar a estrutura 3D da base de dados PDB – Exemplo: receptor muscarínico M_3 – código PDB: 4DAJ

1. Acesse: <https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
2. Na barra de busca entre a proteína desejada: nome ou código – Exemplo: 4DAJ



3. Nessa página temos uma série de informações, dentre elas o link para o artigo original, resolução da estrutura, detalhes experimentais. Abaixo na página temos ainda informações sobre estruturas co-cristalizadas. No exemplo, a estrutura do receptor M_3 foi co-cristalizado com o ligante tiotrópio (Query: OHK) e o íon fostato (Query: PO4). Essas informações são necessárias para modificar o arquivo do receptor no formato do *input* do docking.

| Small Molecules | | | | |
|---|------------|--|---------------------------|---|
| Ligands 2 Unique | | | | |
| ID | Chains | Name / Formula / InChI Key | 2D Diagram & Interactions | 3D Interactions |
| OHK Query on OHK Download SDF File Download CCD File | A, B, C, D | (1R,2R,4S,5S,7S)-7-[(hydroxy(dithiophen-2-yl)acetyl)oxy]-9,9-dimethyl-3-oxa-9-azoniatricyclo[3.3.1.0 ^{2,4}]nonane Tiotropium (Synonym) C ₁₉ H ₂₂ N O ₄ S ₂ LERNTVKEWCAPOY-DZZGSBJMSA-N | | Ligand Explorer NGL Binding Pocket (JSmol) Electron Density (JSmol) |
| PO4 Query on PO4 Download SDF File Download CCD File | A, B, C, D | PHOSPHATE ION O ₄ P NBIXXVUZAFLEC-UHFFFAOYSA-K | | Ligand Explorer NGL Binding Pocket (JSmol) Electron Density (JSmol) |

4. Para fazer o download da estrutura 3D do receptor clique no menu “Download Files” e “PDB Format”.

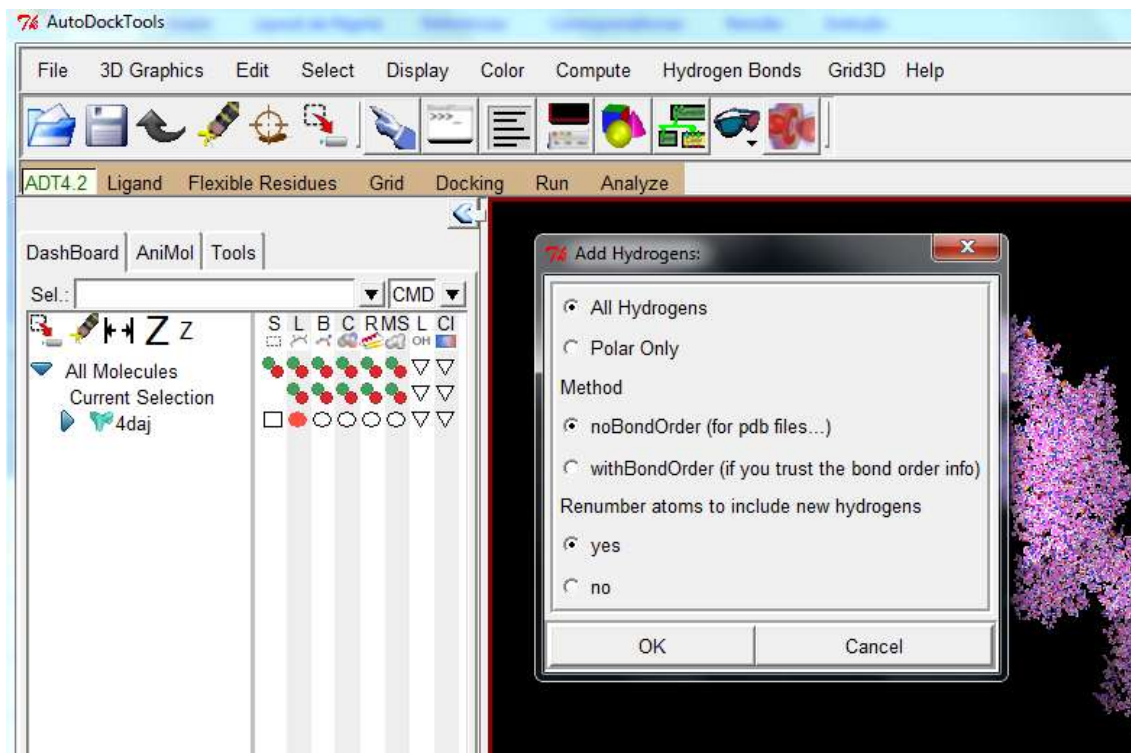
5. Salve esse arquivo no computador com o nome: 4daj

b) Modificando o arquivo original para o formato adequado para o docking

6. Primeiramente, abra o arquivo com o AutoDock Tools. Abra o programa (clique em “Remind me later”), clique em “File” – “Read molecule”, escolha o arquivo “4daj”

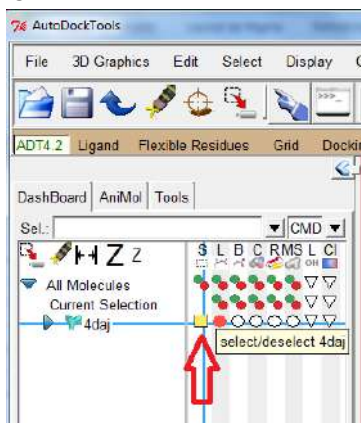
7. Depois vá em “Edit” – “Delete water”

8. Novamente em “Edit” – “Hydrogens” – “Add” (mantenha as opções padrão) – “OK”



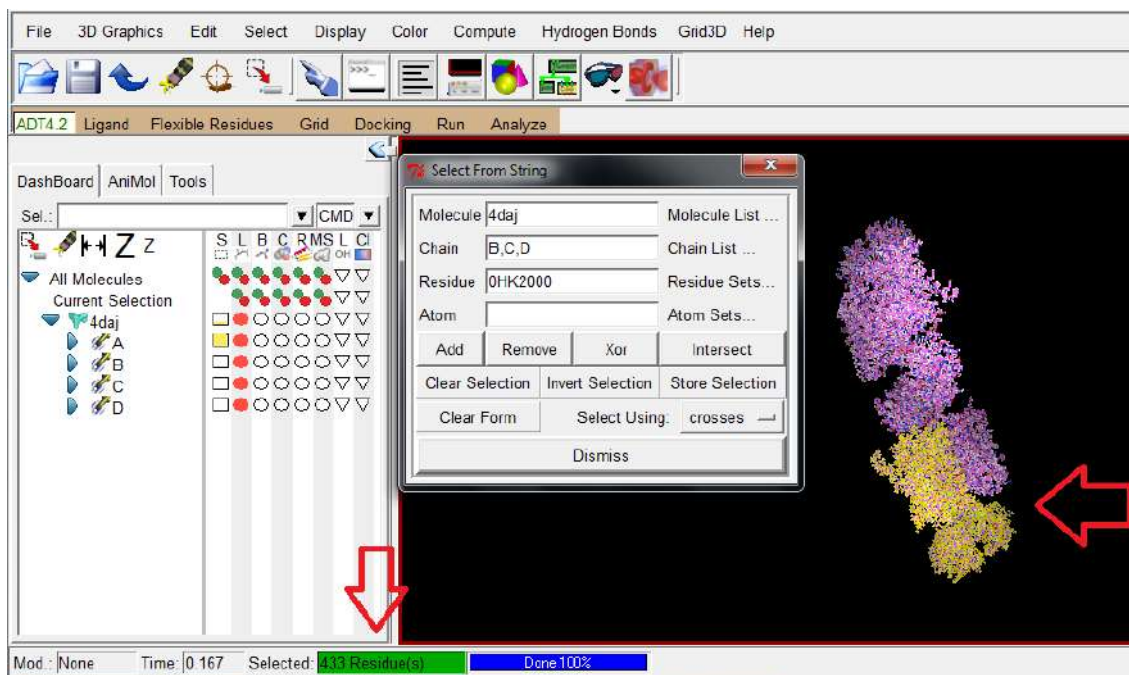
9. É necessário deletar as cadeias co-cristalizadas e os ligantes do arquivo original. Manteremos apenas a cadeia “A” selecionada como estrutura mínima para o docking. Siga os passos, conforme o exemplo.

10. No menu a esquerda (aba DashBoard) selecione o receptor marcando o quadradinho ao lado dele na coluna “S”.



11. Na barra superior clique em “Select” – “Select from String”:

- Preencha os campos: Molecule: 4daj
Chain: B,C,D
Residue: 0HK2000
- Agora clique em “Remove”;



12. Confira se deu certo: apenas uma parte da estrutura deve ficar selecionada (em amarelo) e na barra em baixo deve aparecer “433 Residues” com na figura acima.

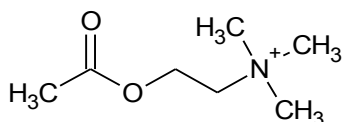
13. Para salvar esse arquivo vá em “File” – “Save” – “Write PDB”

14. Marque [x] “Write All Bounds as CONECT Records”

15. Escolha um local em “BROWSE” e dê o nome de “4daj_input” – “OK” e “OK” novamente.

C – Estrutura do Ligante

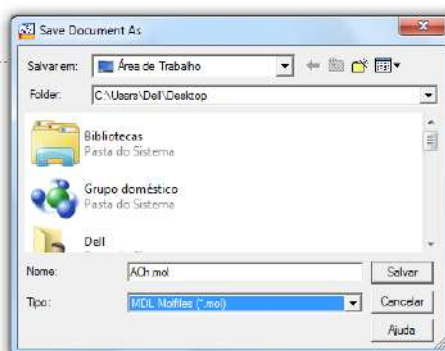
16. Abra o programa ChemSketch e desenhe a acetilcolina como na estrutura abaixo.



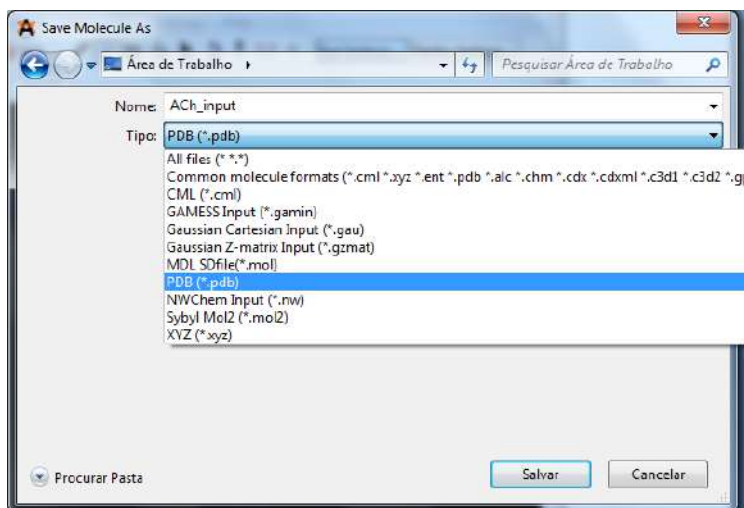
17. Selecione a molécula. Vá no menu “Tools” – “Clean Structure”

18. Novamente em “Tools” – “3D structure optimization”

19. Agora para salvar: “File” – “Save as” mude o Tipo (formato do arquivo) para “MDL Molfiles” (*.mol), escolha o local e o nome “ACh.mol” – “Salvar”

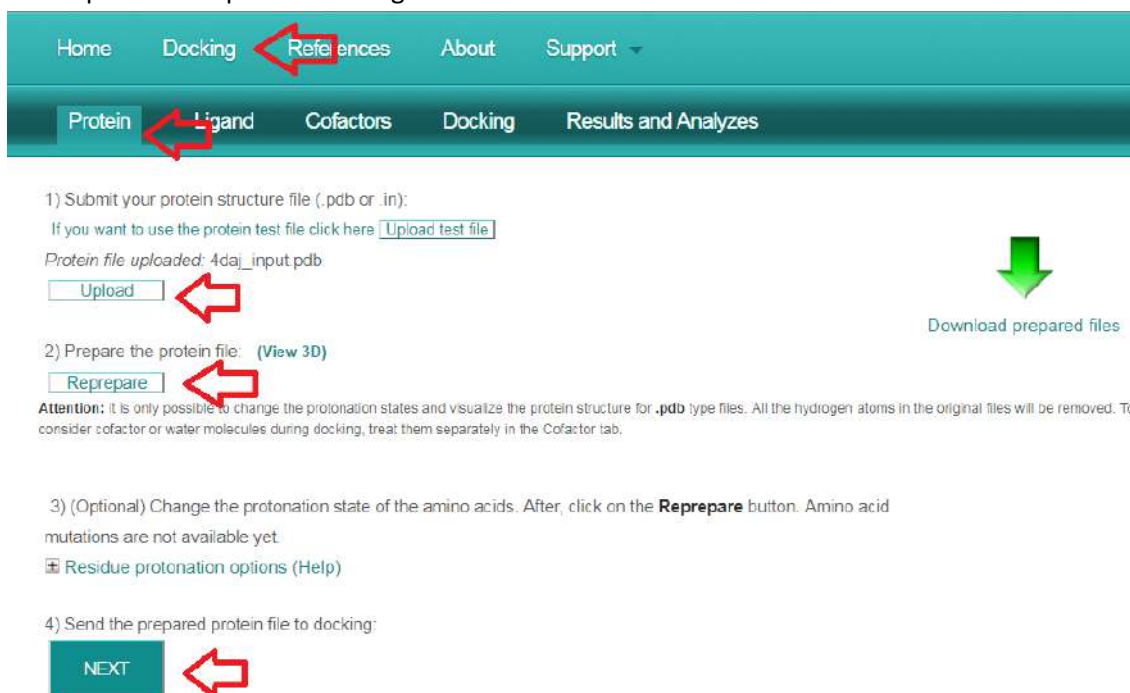


20. Abra o programa Avogadro. Vá em “File” – “Open” e selecione o arquivo “ACh.mol”
21. No menu acima, vá em “Extensions” – “Optimize Geometry”
22. Para salva: “File” – “Save as” e mude o Tipo (formato do arquivo) para PDB (*.pdb), escolha o local e o nome “ACh_input” – “Salvar”



D – Docking

23. Acesse: <http://dockthor.lncc.br/> ou no Google pesquise por DockThor.
24. Clique em “Docking” – “Protein” – “Upload” e selecione o arquivo “4daj_input”
25. Clique em “Prepare” e em seguida em “Next”



26. Na aba “Ligand” – “Upload” e selecione o arquivo “ACh_input”
27. Marque [x] “Add hydrogens”
28. Clique em “Prepare” e em seguida em “Next”

29. Na aba “Cofactors” apenas clique em “Next”

30. Na aba “Docking” preencha os campos como na figura abaixo.

Files uploaded:
 Protein: 4daj_input.pdb
 Ligand: ACh_input.pdb
 Email:
 Grid center (Xc, Yc, Zc): (View grid in 3D)
 If you want to use the grid center for the test files click here
 Grid dimensions ($\pm\Delta x$, $\pm\Delta y$, $\pm\Delta z$):
 Discretization of the grid energy (Å): Grid points: (max: 1,000,000)
 Job label:
☐ Genetic Algorithm (GA) Parameters Settings
 Attention: The program was optimized for the default values - change these values at your own risk.
 → Run your docking job:
☐ Please select Checkbox to subscribe DockThor e-Newsletters

31. Visualize a caixa do docking em “View grid in 3D”. Você deve sempre acertar a localização da caixa para que englobe o sitio ativo. Esses parâmetros irão mudar de proteína para proteína.

32. Clique em “Dock”. Você deve receber os resultados por email.


E – Analisando os resultados

33. Na Aba “Results and Analyzes” marque a opção ☒ Analysis by interaction energy.

34. Clique em “Analyze” e faça o Download dos resultados

1) Perform the clustering and ranking of the docking poses:
☐ Analysis by total energy
☒ Analysis by interaction energy
☐ Result Settings
 2) (Optional) Submit your reference ligand file for redocking analyses:

 3) Analyze your docking results:

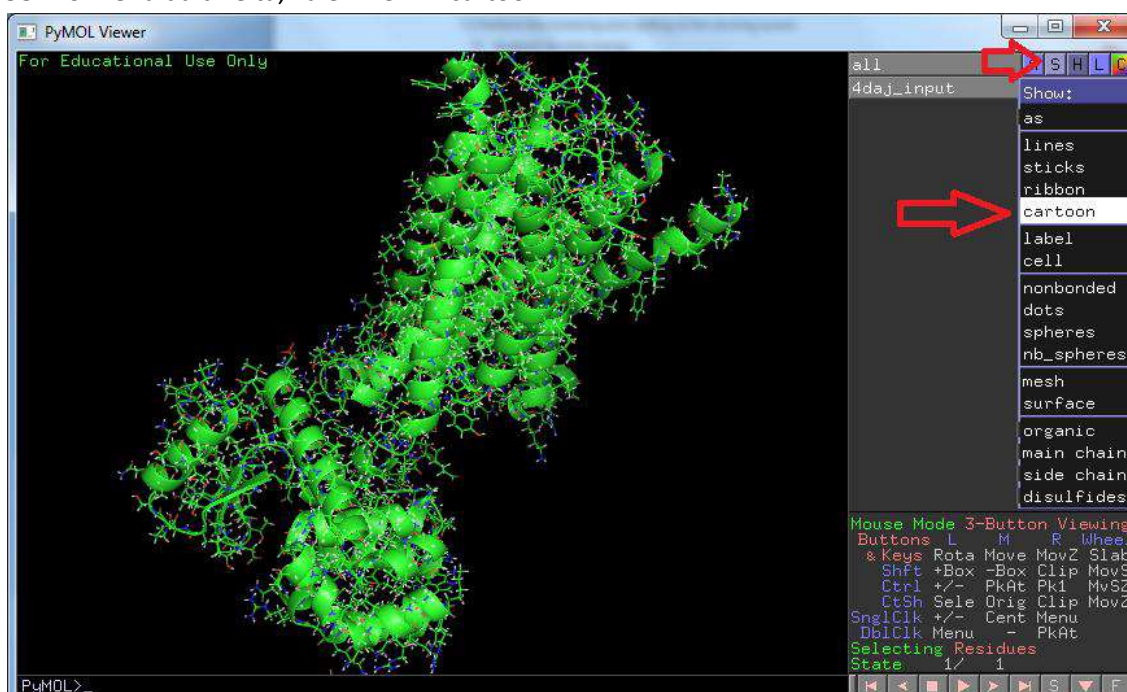
 Download results

35. Extraia e salve a pasta com os resultados. Nomeie-a “Docking 4daj_ACh”

36. Abra o programa Pymol.

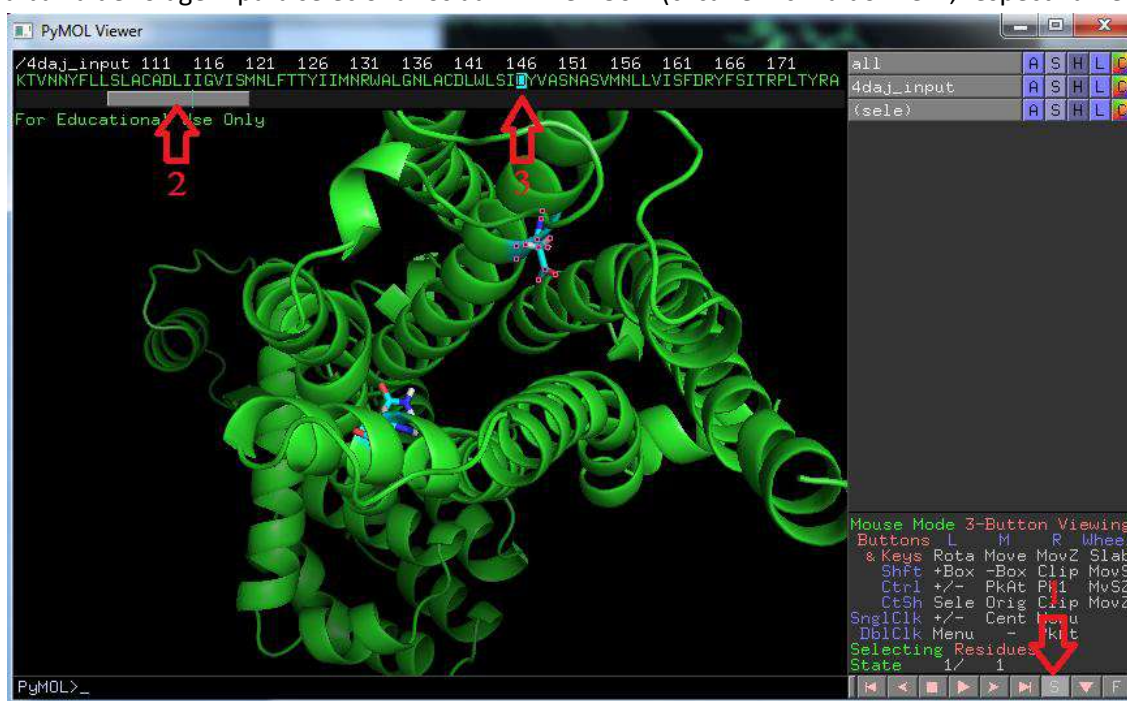
37. Vá em “File” – “Open” e abra o arquivo do receptor “4daj_input”

38. No menu da direita, vá em “S” – “cartoon”



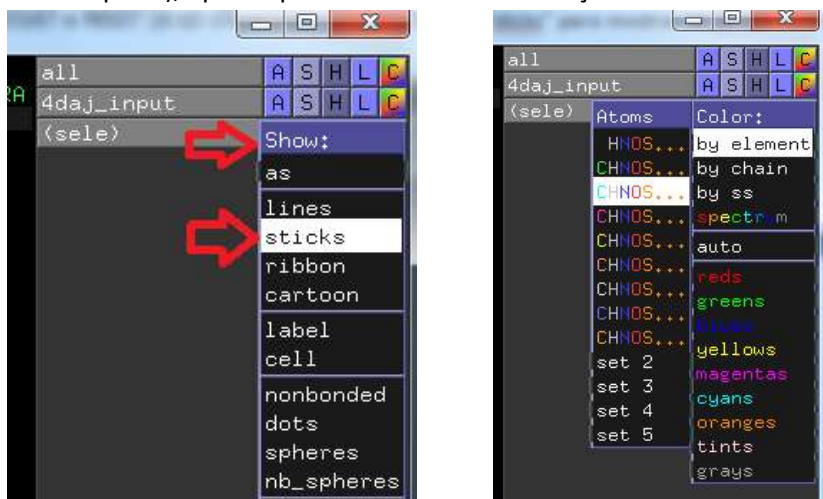
39. Ainda no menu a direita, vá em “H” – “lines”

40. No menu abaixo e a direita clique em “S”. Irá aparecer a lista de aminoácidos no topo. Então use a barra de rolagem para selecionar os aa D147 e N507 (clique em cima do D e N, respectivamente)



41. Em seguida, no menu da direita, vá em “S” da linha “(sele)” – selecione “sticks” para mostrar os aa que selecionados.

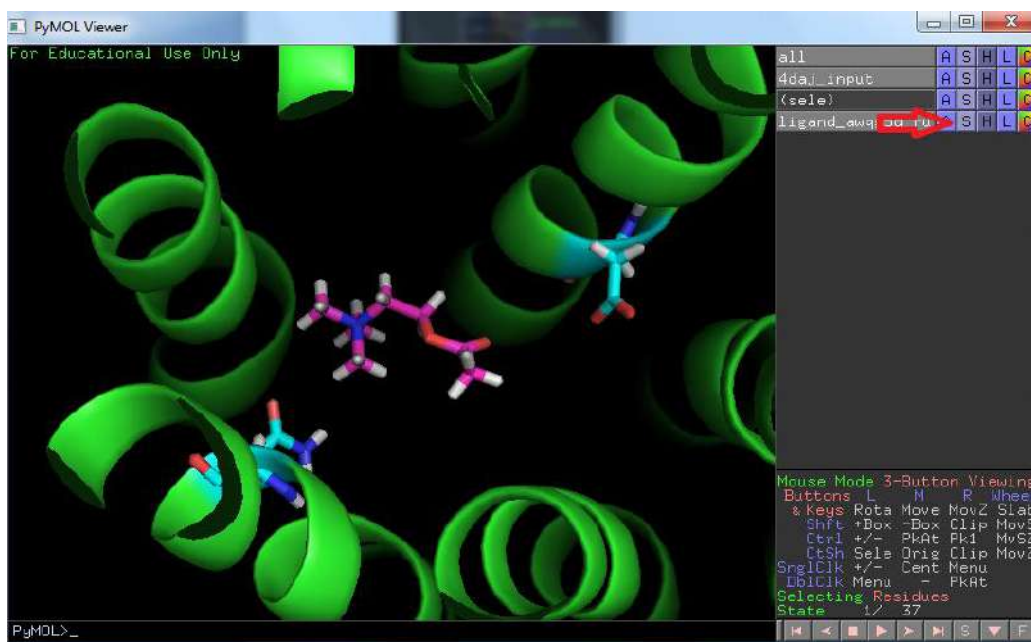
42. Agora vá em “C” da linha (sele)- selecione “by element” e escolha a terceira opção (carbono em azul turquesa), apenas para melhorar a visualização.



43. Clique em qualquer parte preta do fundo para desfazer a seleção. Você pode movimentar a proteína com o mouse e dar zoom com o botão de rolagem do mouse ou o botão direito.

44. Para abrir os resultados do Docking. Vá em “File” – “Open” – encontre a pasta com os resultados “Docking 4daj_ACh” - Abra a pasta “results” e selecione o arquivo o primeiro arquivo (final “_run_1”)

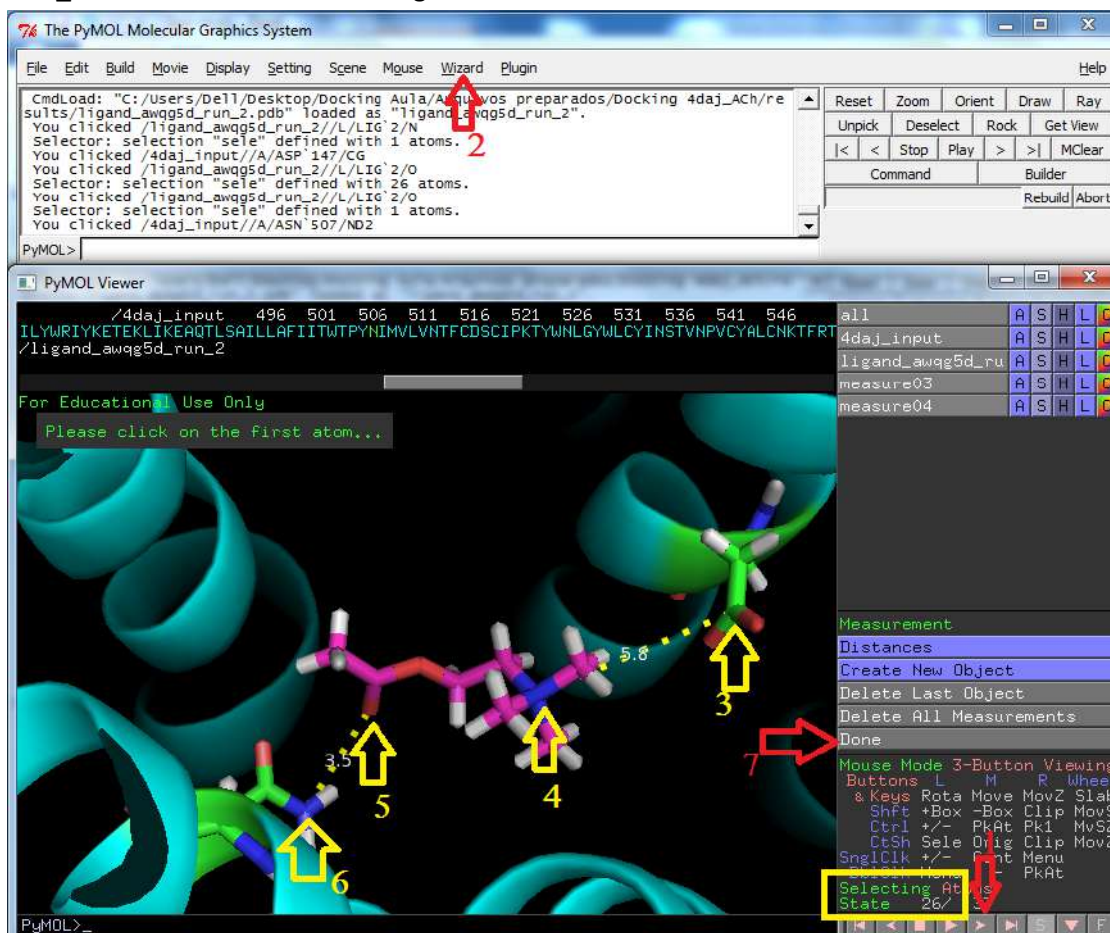
45. No menu a direita vá em “S” na linha “ligand” e selecione “sticks”



46. Agora no menu abaixo e a direita use o botão “►” para passar os poses geradas no docking(1). Nessa etapa busca-se por posições coerentes. Encontre alguma no qual o nitrogênio quaternizado esteja voltado ou mais próximo ao as D147.

47. Em seguida, na barra superior clique em “Wizard” – “Measurement”(2). Selecione as distâncias que quer medir: COO^- (3) até N^+ (4); e MeCOO^- (5) até NH_2 (6) – apenas clique em cima dos átomos. Siga numeração na figura abaixo. Você vai precisar movimentar a visualização com o mouse.

48. Clique “Done”(7). No exemplo as distâncias são 5.8 Å (3-4) e 3.5 Å (5-6) na análise do arquivo “run_2” o modelo 26. Cada docking será diferente.



Obs: Essa pose, provavelmente, é a mais correta devido às distâncias e posicionamento dos grupos farmacóforos da ACh, em relação aos aminoácidos com os quais interage, serem mais coerentes. A inspeção visual para decisão da pose correta é utilizada especialmente quando se tem informações a respeito de como outros ligantes se posicionam no receptor.

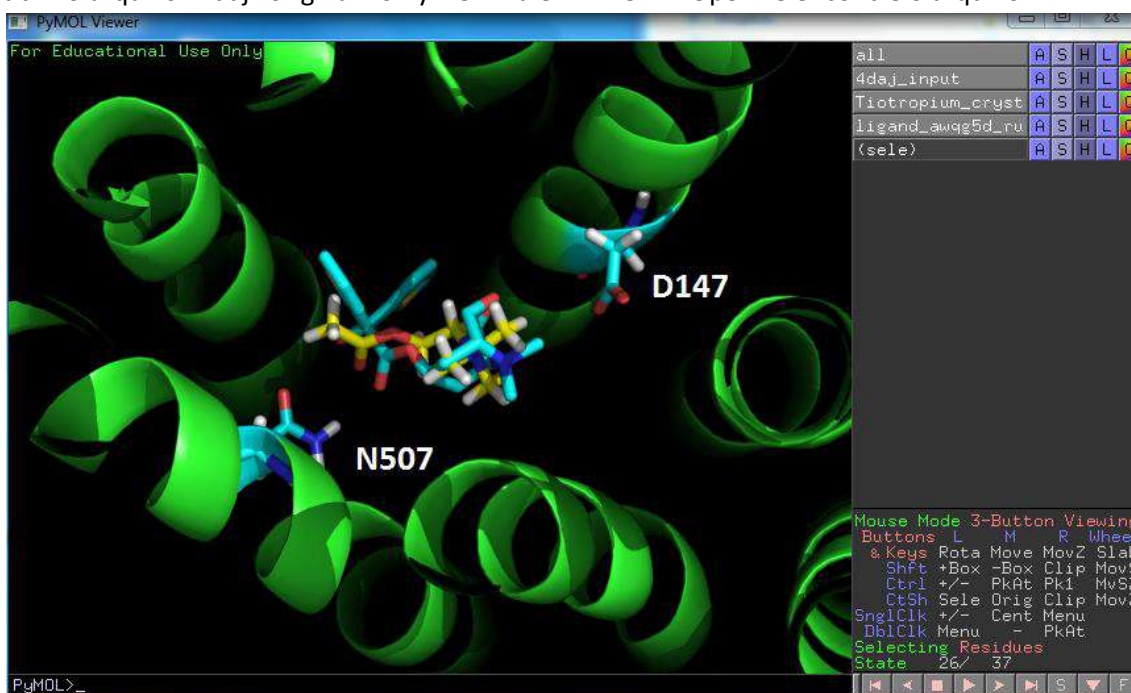
49. Com essa informação, vamos buscar qual o valor do ΔG de ligação (*binding or interaction energy*) para essa pose. Abra a pasta “Docking 4daj_ACh” – “results” – encontre o arquivo correspondente ao modelo a ser analisado, no formato .LOG; Clique com o botão direito do mouse e selecione para abrir com WordPad; “Abrir com” – “WordPad”

50. Nesse arquivo encontre as informações referentes ao modelo a ser analisado, no caso do exemplo foi o modelo 26 “\$Leader_Info 26”.

A Energia de interação é o somatória “vdW + Coulomb”, onde vdW são interações de superfície e Coulomb são interações eletrostáticas. Então, $I.Energy_{run2(26)} = -13,355 \text{ Kcal/mol}$.


```
$Leader_Info 26 {
    Num_Members = 44
    Total_Energy = 4.552
    vdW = -12.853
    Coulomb = -0.502
    Internal = 17.907
    rmsd = 4.840
}
```

51. Para ver a sobreposição da acetilcolina atracada com a molécula de referência Tiotrópio é só abrir o arquivo “4daj” original no PyMOL. Vá em “File” – “Open” e encontre o arquivo.



Obs. Nessa sobreposição podemos ver que a disposição/orientação dos grupos farmacóforos N^+ e $C=O$ são semelhantes com os resultados experimentais (co-cristalização com o tiotrópio). Quanto melhor essa sobreposição, maior é a confiança na escolha da pose correta.

Anexo 2: Resultados da busca de possíveis alvos moleculares utilizando o programa SwissTargetPrediction

a) Resultados da predição de alvos moleculares para o compoto **L01** gerado pelo programa SwissTargetPrediction;

| Target | Common name | Uniprot ID | ChEMBL ID | Probability* | # sim. cmpds (3D / 2D) | Target Class |
|---|-------------|------------|---------------|------------------------|------------------------|--------------|
| Glucosylceramidase | GBA | P04062 | CHEMBL2179 | <div><div></div></div> | 7 / 39 | Enzyme |
| Non-lysosomal glucosylceramidase | GBA2 | Q9HCG7 | CHEMBL3761 | <div><div></div></div> | 8 / 37 | Enzyme |
| Lysosomal alpha-glucosidase | GAA | P10253 | CHEMBL2608 | <div><div></div></div> | 2 / 18 | Enzyme |
| Glucosylase | MGAM | O43451 | CHEMBL2074 | <div><div></div></div> | 5 / 44 | Enzyme |
| Sucrase | SI | P14410 | CHEMBL2748 | <div><div></div></div> | 5 / 44 | Enzyme |
| Uncharacterized protein (<i>by homology</i>) | | C9JNC2 | | <div><div></div></div> | 5 / 42 | Enzyme |
| Tissue alpha-L-fucosidase | FUCA1 | P04066 | CHEMBL4176 | <div><div></div></div> | 15 / 44 | Enzyme |
| Plasma alpha-L-fucosidase (<i>by homology</i>) | FUCA2 | Q9BTY2 | CHEMBL2271 | <div><div></div></div> | 15 / 44 | Enzyme |
| Lysosomal alpha-mannosidase E peptide | MAN2B1 | O00754 | CHEMBL4059 | <div><div></div></div> | 1 / 1 | Enzyme |
| Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 | TDP1 | Q9NUW8 | CHEMBL1075138 | <div><div></div></div> | 18 / 1 | Enzyme |
| Glycogen phosphorylase, liver form | PYGL | P06737 | CHEMBL2568 | <div><div></div></div> | 8 / 3 | Enzyme |
| Glycogen phosphorylase, muscle form | PYGM | P11217 | CHEMBL3526 | <div><div></div></div> | 8 / 3 | Enzyme |
| Glycogen phosphorylase, brain form (<i>by homology</i>) | PYGB | P11216 | CHEMBL3856 | <div><div></div></div> | 8 / 3 | Enzyme |
| Cholinesterase | BCHE | P06276 | CHEMBL1914 | <div><div></div></div> | 1 / 1 | Enzyme |
| Acetylcholinesterase | ACHE | P22303 | CHEMBL220 | <div><div></div></div> | 1 / 1 | Enzyme |

b) Resultados da predição de alvos moleculares para o compoto **L14** gerado pelo programa SwissTargetPrediction

| Target | Common name | Uniprot ID | ChEMBL ID | Probability* | # sim. cmpds (3D / 2D) | Target Class |
|--|-------------|------------|------------|------------------------|------------------------|--------------|
| Glucosylceramidase | GBA | P04062 | CHEMBL2179 | <div><div></div></div> | 14 / 39 | Enzyme |
| Glucosylase | MGAM | O43451 | CHEMBL2074 | <div><div></div></div> | 19 / 44 | Enzyme |
| Sucrase | SI | P14410 | CHEMBL2748 | <div><div></div></div> | 19 / 44 | Enzyme |
| Uncharacterized protein (<i>by homology</i>) | | C9JNC2 | | <div><div></div></div> | 19 / 42 | Enzyme |
| Lysosomal alpha-glucosidase | GAA | P10253 | CHEMBL2608 | <div><div></div></div> | 5 / 18 | Enzyme |
| Tissue alpha-L-fucosidase | FUCA1 | P04066 | CHEMBL4176 | <div><div></div></div> | 27 / 44 | Enzyme |
| Plasma alpha-L-fucosidase (<i>by homology</i>) | FUCA2 | Q9BTY2 | CHEMBL2271 | <div><div></div></div> | 27 / 44 | Enzyme |
| Neutral alpha-glucosidase AB | GANAB | Q14697 | CHEMBL2519 | <div><div></div></div> | 5 / 4 | Enzyme |
| Neutral alpha-glucosidase C (<i>by homology</i>) | GANB | Q8TET4 | CHEMBL2520 | <div><div></div></div> | 5 / 4 | Enzyme |
| Ceramide glucosyltransferase | UGCG | Q16739 | CHEMBL2063 | <div><div></div></div> | 2 / 23 | Enzyme |
| Glycogen debranching enzyme | AGL | P35573 | CHEMBL5272 | <div><div></div></div> | 2 / 3 | Enzyme |
| Beta-galactosidase | GLB1 | P16278 | CHEMBL2522 | <div><div></div></div> | 3 / 13 | Enzyme |
| Beta-galactosidase-1-like protein (<i>by homology</i>) | GLB1L | Q6UWU2 | | <div><div></div></div> | 3 / 13 | Enzyme |
| Alpha-galactosidase A | GLA | P06280 | CHEMBL2524 | <div><div></div></div> | 4 / 4 | Enzyme |
| Alpha-N-acetylgalactosaminidase (<i>by homology</i>) | NAGA | P17050 | CHEMBL3132 | <div><div></div></div> | 4 / 4 | Enzyme |

c) Resultados da predição de alvos moleculares para o compoto **L15** gerado pelo programa SwissTargetPrediction;

| Target | Common name | Uniprot ID | ChEMBL ID | Probability* | # sim. cmpds (3D / 2D) | Target Class |
|--|-------------|------------|---------------|------------------------|------------------------|--------------|
| Glucosylceramidase | GBA | P04062 | CHEMBL2179 | <div><div></div></div> | 14 / 21 | Enzyme |
| Tissue alpha-L-fucosidase | FUCA1 | P04066 | CHEMBL4176 | <div><div></div></div> | 22 / 16 | Enzyme |
| Plasma alpha-L-fucosidase (<i>by homology</i>) | FUCA2 | Q9BTY2 | CHEMBL2271 | <div><div></div></div> | 22 / 16 | Enzyme |
| Glucoamylase | MGAM | O43451 | CHEMBL2074 | <div><div></div></div> | 15 / 25 | Enzyme |
| Sucrase | SI | P14410 | CHEMBL2748 | <div><div></div></div> | 15 / 25 | Enzyme |
| Uncharacterized protein (<i>by homology</i>) | | C9JNC2 | | <div><div></div></div> | 14 / 23 | Enzyme |
| Lysosomal alpha-glucosidase | GAA | P10253 | CHEMBL2608 | <div><div></div></div> | 6 / 13 | Enzyme |
| Ceramide glucosyltransferase | UGCG | Q16739 | CHEMBL2063 | <div><div></div></div> | 1 / 17 | Enzyme |
| Glycogen debranching enzyme | AGL | P35573 | CHEMBL5272 | <div><div></div></div> | 2 / 2 | Enzyme |
| Alpha-galactosidase A | GLA | P06280 | CHEMBL2524 | <div><div></div></div> | 4 / 4 | Enzyme |
| Alpha-N-acetylgalactosaminidase (<i>by homology</i>) | NAGA | P17050 | CHEMBL3132 | <div><div></div></div> | 4 / 4 | Enzyme |
| Beta-galactosidase | GLB1 | P16278 | CHEMBL2522 | <div><div></div></div> | 3 / 2 | Enzyme |
| Beta-galactosidase-1-like protein (<i>by homology</i>) | GLB1L | Q6UWU2 | | <div><div></div></div> | 3 / 2 | Enzyme |
| Microtubule-associated protein tau | MAPT | P10636 | CHEMBL1293224 | <div><div></div></div> | 2 / 1 | Unclassified |
| Neutral alpha-glucosidase AB | GANAB | Q14697 | CHEMBL2519 | <div><div></div></div> | 5 / 2 | Enzyme |

d) Resultados da predição de alvos moleculares para o compoto **L16** gerado pelo programa SwissTargetPrediction;

| Target | Common name | Uniprot ID | ChEMBL ID | Probability* | # sim. cmpds (3D / 2D) | Target Class |
|---|-------------|------------|---------------|------------------------|------------------------|-------------------|
| Muscarinic acetylcholine receptor M2 | CHRM2 | P08172 | CHEMBL211 | <div><div></div></div> | 5 / 17 | Membrane receptor |
| Muscarinic acetylcholine receptor M4 | CHRM4 | P08173 | CHEMBL1821 | <div><div></div></div> | 5 / 17 | Membrane receptor |
| Muscarinic acetylcholine receptor M5 | CHRM5 | P08912 | CHEMBL2035 | <div><div></div></div> | 5 / 11 | Membrane receptor |
| Muscarinic acetylcholine receptor M1 | CHRM1 | P11229 | CHEMBL216 | <div><div></div></div> | 5 / 17 | Membrane receptor |
| Muscarinic acetylcholine receptor M3 | CHRM3 | P20309 | CHEMBL245 | <div><div></div></div> | 5 / 14 | Membrane receptor |
| Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 | TDP1 | Q9NUW8 | CHEMBL1075138 | <div><div></div></div> | 26 / 2 | Enzyme |
| Glucosylceramidase | GBA | P04062 | CHEMBL2179 | <div><div></div></div> | 3 / 33 | Enzyme |
| Microtubule-associated protein tau | MAPT | P10636 | CHEMBL1293224 | <div><div></div></div> | 22 / 1 | Unclassified |
| Tissue alpha-L-fucosidase | FUCA1 | P04066 | CHEMBL4176 | <div><div></div></div> | 5 / 27 | Enzyme |
| Plasma alpha-L-fucosidase (<i>by homology</i>) | FUCA2 | Q9BTY2 | CHEMBL2271 | <div><div></div></div> | 5 / 27 | Enzyme |
| Glycogen phosphorylase, liver form | PYGL | P06737 | CHEMBL2568 | <div><div></div></div> | 6 / 3 | Enzyme |
| Glycogen phosphorylase, muscle form | PYGM | P11217 | CHEMBL3526 | <div><div></div></div> | 6 / 3 | Enzyme |
| Glycogen phosphorylase, brain form (<i>by homology</i>) | PYGB | P11216 | CHEMBL3856 | <div><div></div></div> | 6 / 3 | Enzyme |
| Glucoamylase | MGAM | O43451 | CHEMBL2074 | <div><div></div></div> | 3 / 32 | Enzyme |
| Sucrase | SI | P14410 | CHEMBL2748 | <div><div></div></div> | 3 / 32 | Enzyme |

e) Resultados da predição de alvos moleculares para o compoto **L18** gerado pelo programa SwissTargetPrediction;

| Target | Common name | Uniprot ID | ChEMBL ID | Probability* | # sim. cmpds (3D / 2D) | Target Class |
|---|-------------|------------|------------|--------------|------------------------|--------------|
| Glucosylceramidase | GBA | P04062 | CHEMBL2179 | | 16 / 33 | Enzyme |
| Tissue alpha-L-fucosidase | FUCA1 | P04066 | CHEMBL4176 | | 30 / 27 | Enzyme |
| Plasma alpha-L-fucosidase (by homology) | FUCA2 | Q9BTY2 | CHEMBL2271 | | 30 / 27 | Enzyme |
| Beta-galactosidase | GLB1 | P16278 | CHEMBL2522 | | 3 / 10 | Enzyme |
| Beta-galactosidase-1-like protein (by homology) | GLB1L | Q6UWU2 | | | 3 / 10 | Enzyme |
| Glycogen phosphorylase, liver form | PYGL | P06737 | CHEMBL2568 | | 4 / 3 | Enzyme |
| Glycogen phosphorylase, muscle form (by homology) | PYGM | P11217 | CHEMBL3526 | | 4 / 3 | Enzyme |
| Glycogen phosphorylase, brain form (by homology) | PYGB | P11216 | CHEMBL3856 | | 4 / 3 | Enzyme |
| Neutral alpha-glucosidase AB | GANAB | Q14697 | CHEMBL2519 | | 5 / 4 | Enzyme |
| Neutral alpha-glucosidase C (by homology) | GANC | Q8TET4 | CHEMBL2520 | | 5 / 4 | Enzyme |
| Glucoamylase | MGAM | O43451 | CHEMBL2074 | | 18 / 32 | Enzyme |
| Sucrase | SI | P14410 | CHEMBL2748 | | 18 / 32 | Enzyme |
| Uncharacterized protein (by homology) | | C9JNC2 | | | 18 / 31 | Enzyme |
| Lysosomal alpha-glucosidase | GAA | P10253 | CHEMBL2608 | | 7 / 16 | Enzyme |
| Ceramide glucosyltransferase (by homology) | UGCG | Q16739 | CHEMBL2063 | | 2 / 22 | Enzyme |

f) Resultados da predição de alvos moleculares para o compoto **L21** gerado pelo programa SwissTargetPrediction;

| Target | Common name | Uniprot ID | ChEMBL ID | Probability* | # sim. cmpds (3D / 2D) | Target Class |
|---|-------------|------------|------------|--------------|------------------------|-------------------|
| Beta-2 adrenergic receptor (by homology) | ADRB2 | P07550 | CHEMBL210 | | 110 / 5 | Membrane receptor |
| Beta-1 adrenergic receptor | ADRB1 | P08588 | CHEMBL213 | | 107 / 5 | Membrane receptor |
| Beta-3 adrenergic receptor (by homology) | ADRB3 | P13945 | CHEMBL246 | | 101 / 5 | Membrane receptor |
| Sodium-dependent noradrenaline transporter | SLC6A2 | P23975 | CHEMBL222 | | 92 / 323 | Transporter |
| Sodium-dependent serotonin transporter | SLC6A4 | P31645 | CHEMBL228 | | 85 / 192 | Transporter |
| Sodium-dependent dopamine transporter | SLC6A3 | Q01959 | CHEMBL238 | | 92 / 323 | Transporter |
| Renin | REN | P00797 | CHEMBL286 | | 42 / 28 | Aspartic Protease |
| Cathepsin D (by homology) | CTSD | P07339 | CHEMBL2581 | | 42 / 28 | Aspartic Protease |
| Napsin-A (by homology) | NAPSA | O96009 | | | 42 / 28 | Aspartic Protease |
| Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-7 (by homology) | CHRNA7 | P36544 | CHEMBL2492 | | 25 / 13 | Ion channel |
| CHRNA7-FAM7A fusion protein (by homology) | CHRFAM7A | Q494W8 | | | 25 / 13 | Ion channel |
| Muscarinic acetylcholine receptor M2 | CHRM2 | P08172 | CHEMBL211 | | 102 / 73 | Membrane receptor |
| Muscarinic acetylcholine receptor M4 (by homology) | CHRM4 | P08173 | CHEMBL1821 | | 103 / 74 | Membrane receptor |
| Muscarinic acetylcholine receptor M5 (by homology) | CHRM5 | P08912 | CHEMBL2035 | | 88 / 45 | Membrane receptor |
| Muscarinic acetylcholine receptor M1 | CHRM1 | P11229 | CHEMBL216 | | 103 / 129 | Membrane receptor |

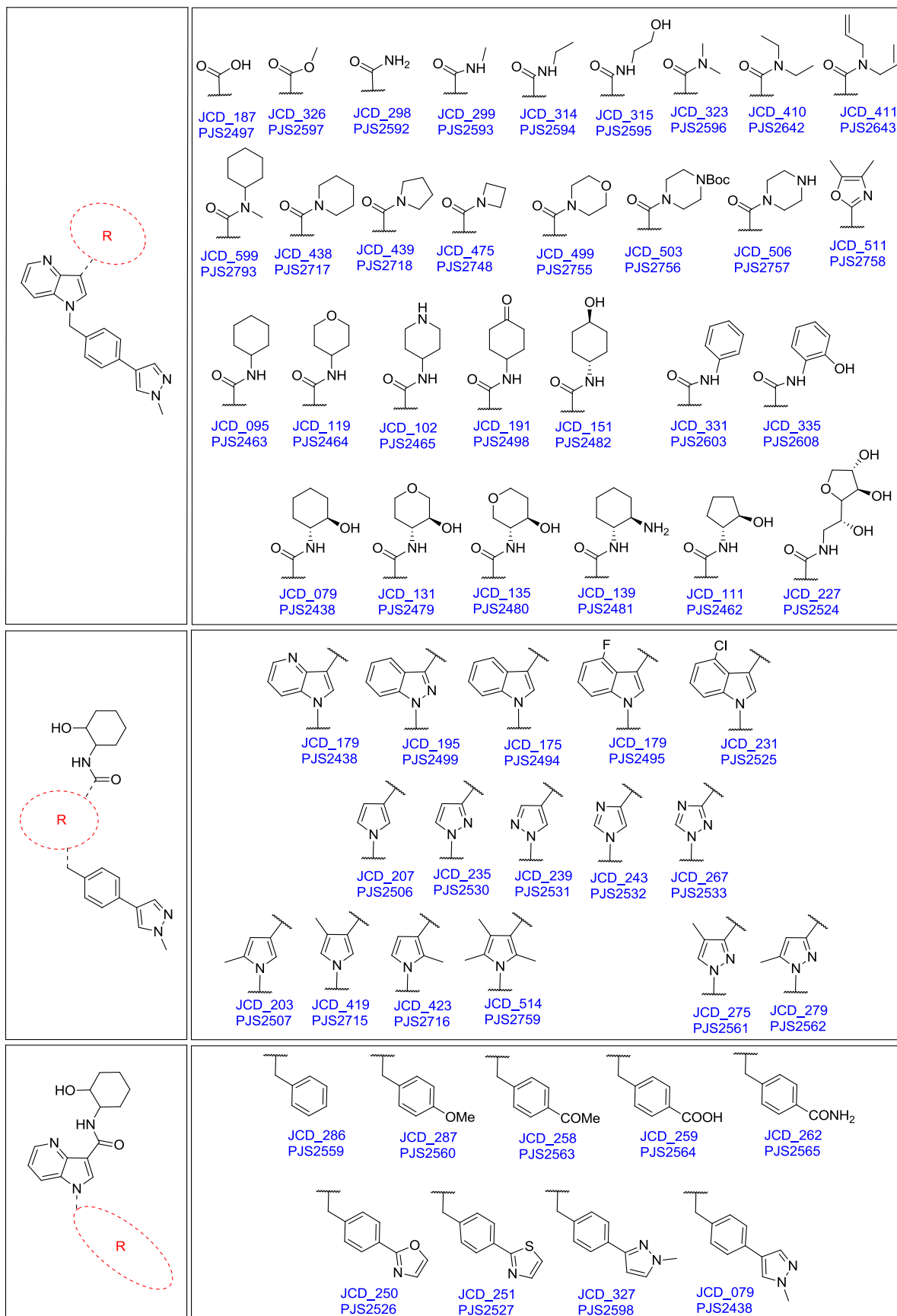
g) Resultados da predição de alvos moleculares para o compoto **L25** gerado pelo programa SwissTargetPrediction;

| Target | Common name | Uniprot ID | ChEMBL ID | Probability* | # sim. cmpds (3D / 2D) | Target Class |
|--|-------------|------------|------------|------------------------|------------------------|-------------------|
| Tissue alpha-L-fucosidase | FUCA1 | P04066 | CHEMBL4176 | <div><div></div></div> | 18 / 35 | Enzyme |
| Plasma alpha-L-fucosidase (<i>by homology</i>) | FUCA2 | Q9BTY2 | CHEMBL2271 | <div><div></div></div> | 18 / 35 | Enzyme |
| Glucoamylase | MGAM | O43451 | CHEMBL2074 | <div><div></div></div> | 28 / 46 | Enzyme |
| Sucrase | SI | P14410 | CHEMBL2748 | <div><div></div></div> | 28 / 46 | Enzyme |
| Uncharacterized protein (<i>by homology</i>) | | C9JNC2 | | <div><div></div></div> | 28 / 45 | Enzyme |
| Lysosomal alpha-glucosidase | GAA | P10253 | CHEMBL2608 | <div><div></div></div> | 7 / 17 | Enzyme |
| Glucosylceramidase | GBA | P04062 | CHEMBL2179 | <div><div></div></div> | 20 / 35 | Enzyme |
| Non-lysosomal glucosylceramidase | GBA2 | Q9HCG7 | CHEMBL3761 | <div><div></div></div> | 14 / 38 | Enzyme |
| Ceramide glucosyltransferase (<i>by homology</i>) | UGCG | Q16739 | CHEMBL2063 | <div><div></div></div> | 6 / 23 | Enzyme |
| Sodium-dependent noradrenaline transporter | SLC6A2 | P23975 | CHEMBL222 | <div><div></div></div> | 3 / 150 | Transporter |
| Sodium-dependent serotonin transporter | SLC6A4 | P31645 | CHEMBL228 | <div><div></div></div> | 1 / 117 | Transporter |
| Sodium-dependent dopamine transporter (<i>by homology</i>) | SLC6A3 | Q01959 | CHEMBL238 | <div><div></div></div> | 3 / 150 | Transporter |
| D(2) dopamine receptor | DRD2 | P14416 | CHEMBL217 | <div><div></div></div> | 2 / 45 | Membrane receptor |
| D(4) dopamine receptor (<i>by homology</i>) | DRD4 | P21917 | CHEMBL219 | <div><div></div></div> | 1 / 13 | Membrane receptor |
| D(3) dopamine receptor | DRD3 | P35462 | CHEMBL234 | <div><div></div></div> | 1 / 17 | Membrane receptor |

h) Resultados da predição de alvos moleculares para o compoto **L26** gerado pelo programa SwissTargetPrediction;

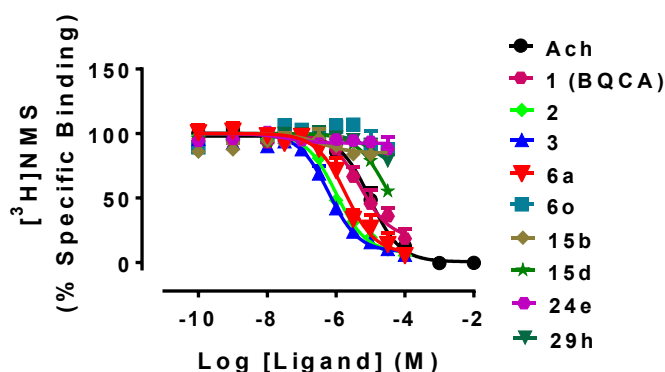
| Target | Common name | Uniprot ID | ChEMBL ID | Probability* | # sim. cmpds (3D / 2D) | Target Class |
|---|-------------|------------|---------------|------------------------|------------------------|-----------------|
| Galectin-9 | LGALS9 | O00182 | CHEMBL5474 | <div><div></div></div> | 1 / 4 | Unclassified |
| Galectin-3 | LGALS3 | P17931 | CHEMBL4531 | <div><div></div></div> | 1 / 12 | Cytosolic other |
| Galectin-9B (<i>by homology</i>) | LGALS9B | Q3B8N2 | | <div><div></div></div> | 1 / 4 | Unclassified |
| Galectin-9C (<i>by homology</i>) | LGALS9C | Q6DKI2 | | <div><div></div></div> | 1 / 4 | Unclassified |
| Glucoamylase | MGAM | O43451 | CHEMBL2074 | <div><div></div></div> | 25 / 21 | Enzyme |
| Sucrase | SI | P14410 | CHEMBL2748 | <div><div></div></div> | 25 / 21 | Enzyme |
| Uncharacterized protein (<i>by homology</i>) | | C9JNC2 | | <div><div></div></div> | 25 / 20 | Enzyme |
| Tissue alpha-L-fucosidase | FUCA1 | P04066 | CHEMBL4176 | <div><div></div></div> | 4 / 7 | Enzyme |
| Plasma alpha-L-fucosidase (<i>by homology</i>) | FUCA2 | Q9BTY2 | CHEMBL2271 | <div><div></div></div> | 4 / 7 | Enzyme |
| Muscleblind-like protein 1 | MBNL1 | Q9NR56 | CHEMBL1293317 | <div><div></div></div> | 6 / 6 | Unclassified |
| Muscleblind-like protein 2 (<i>by homology</i>) | MBNL2 | Q5VZF2 | | <div><div></div></div> | 6 / 6 | Unclassified |
| Muscleblind-like protein 3 (<i>by homology</i>) | MBNL3 | Q9NUK0 | | <div><div></div></div> | 6 / 6 | Unclassified |
| Sodium-dependent noradrenaline transporter | SLC6A2 | P23975 | CHEMBL222 | <div><div></div></div> | 1 / 55 | Transporter |
| Sodium-dependent serotonin transporter (<i>by homology</i>) | SLC6A4 | P31645 | CHEMBL228 | <div><div></div></div> | 1 / 42 | Transporter |
| Sodium-dependent dopamine transporter (<i>by homology</i>) | SLC6A3 | Q01959 | CHEMBL238 | <div><div></div></div> | 1 / 55 | Transporter |

Anexo 3: Estrutura química dos derivados arilpirrólicos sintetizados durante o estágio doutoral sanduíche em parceria com a Monash University



Anexo 4: Supporting Information "Synthesis and Pharmacological Evaluation of Heterocyclic Carboxamides: Positive Allosteric Modulators of the M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor with Weak Agonist Activity and Diverse Modulatory Profiles"

A



B

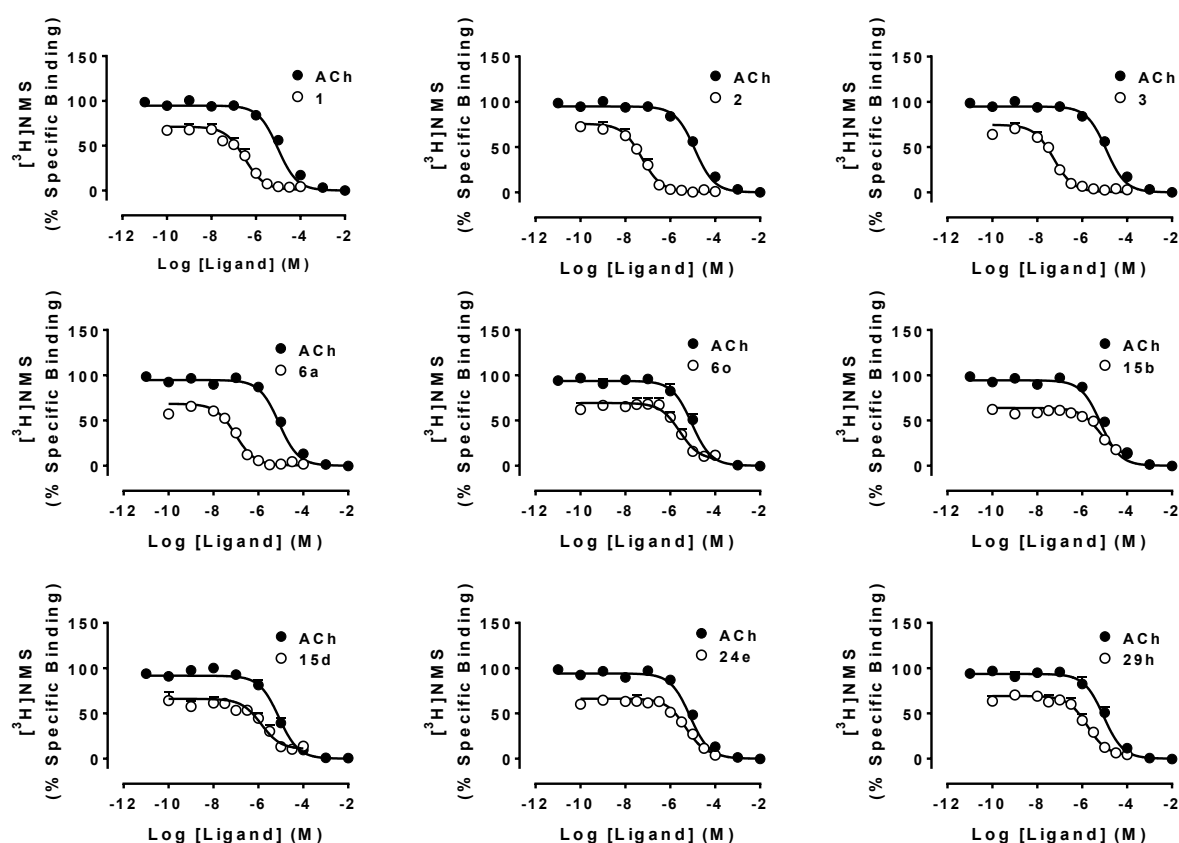


Figure 1. The novel PAMs display different degrees of binding cooperativity with orthosteric ligands at the M₁ mAChR. Whole cell radioligand equilibrium binding between 0.2 nM $[^3\text{H}]\text{NMS}$ and varying concentrations of PAMs in the absence (A) or presence (B) of an EC_{20} concentration of ACh. The full ACh curves (solid points) were included as controls. The curves represent the best global fit of an allosteric ternary complex model (Eq. 1). Data points represent the mean \pm SEM of four experiments performed in duplicate.

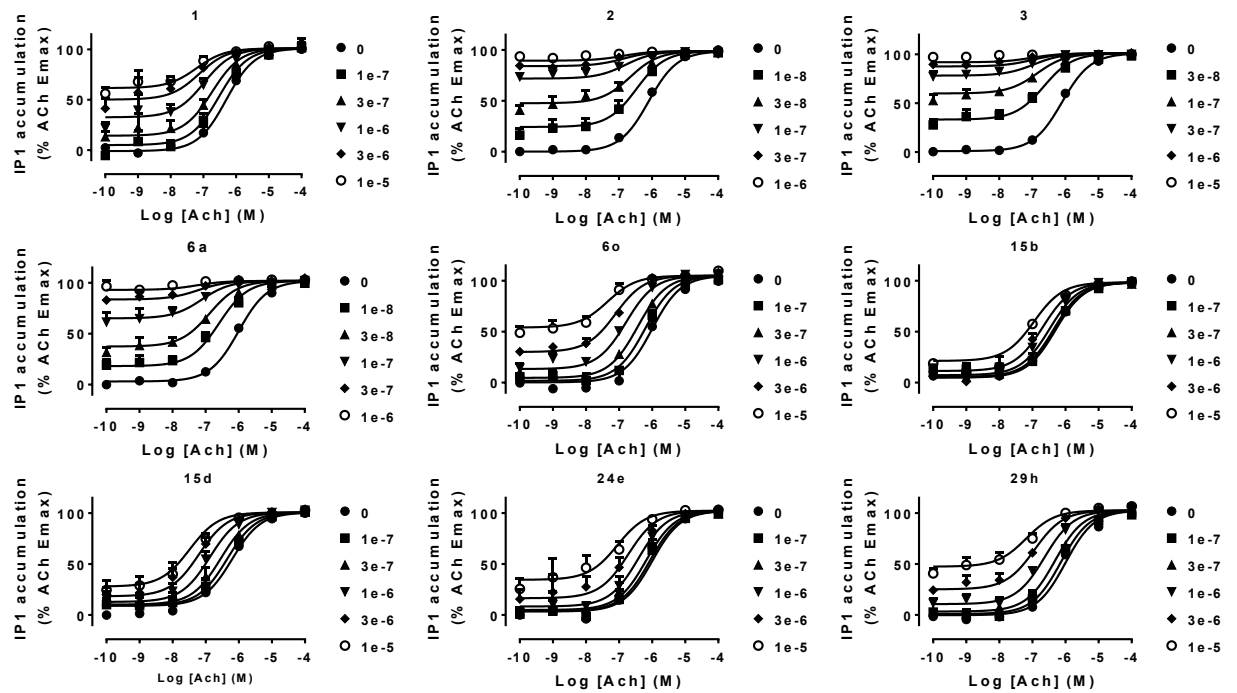


Figure 2. The novel PAMs display different degrees of agonism and functional cooperativity with ACh at the M_1 mAChR. Functional interactions between ACh and increasing concentrations of M_1 PAMs in an IP₁ accumulation assay. The curves represent the best global fit of an operational model of allosterism and agonism (Eq. 2, Experimental section). Data points represent the mean \pm SEM of four experiments performed in duplicate.

Anexo 5: Artigo “Aqueous semisynthesis of C-glycoside glycamines from agarose”
***In: Beilstein J. Org. Chem.* 2017, 13, 1222–1229.**



Aqueous semisynthesis of C-glycoside glycamines from agarose

Juliana C. Cunico Dallagnol¹, Alexandre Orsato², Diogo R. B. Ducatti³, Miguel D. Nosedá³, Maria Eugênia R. Duarte³ and Alan G. Gonçalves^{*1}

Letter

Open Access

Address:

¹Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Avenida Lothario Meissner, 3400, Curitiba, Paraná, Brazil, ²Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid (Pr 445), Km 380, PO Box 10011, Londrina, Paraná, Brazil and ³Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Avenida Francisco H. dos Santos, 120, PO Box 19046, Curitiba, Paraná, Brazil

Email:

Alan G. Gonçalves^{*} - alan.goncalves@ufpr.br

^{*} Corresponding author

Keywords:

amino sugar; 3,6-anhydro- α -L-galactopyranose; polysaccharide (agar); protecting-group-free; reductive amination

Beilstein J. Org. Chem. **2017**, *13*, 1222–1229.

doi:10.3762/bjoc.13.121

Received: 13 March 2017

Accepted: 09 June 2017

Published: 23 June 2017

Associate Editor: S. Flitsch

© 2017 Dallagnol et al.; licensee Beilstein-Institut.

License and terms: see end of document.

Abstract

Agarose was herein employed as starting material to produce primary, secondary and tertiary C-glycoside glycamines, including mono- and disaccharide structures. The semisynthetic approach utilized was generally based on polysaccharide-controlled hydrolysis followed by reductive amination. All reactions were conducted in aqueous media and without the need of hydroxyl group protection. We were able to identify optimal conditions for the reductive amination of agar hydrolysis products and to overcome the major difficulties related to this kind of reaction, also extending it to reducing anhydrosugars. The excess of ammonium acetate, methyl- or dimethylamine, and the use of a diluted basic (pH 11) reaction media were identified as important aspects to achieve improved yields, as well as to decrease the amount of byproducts commonly related to reductive amination of carbohydrates. This strategy allowed the transposition of the 3,6-anhydro- α -L-galactopyranose unit (naturally present in the agarose structure) to all glycamines synthesized, constituting an amino-substituted C-threofuranoside moiety, which is closely related to (+)-muscarine.

Findings

Agarose (**1**) is the term utilized to describe a type of galactose-containing polysaccharides biosynthesized by certain species of algae belonging to the division *Rhodophyta* (red seaweeds). It is a linear biopolymer constituted of the disaccharide repeating unit (1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranose-(1 \rightarrow 4)-3,6-anhydro- α -L-

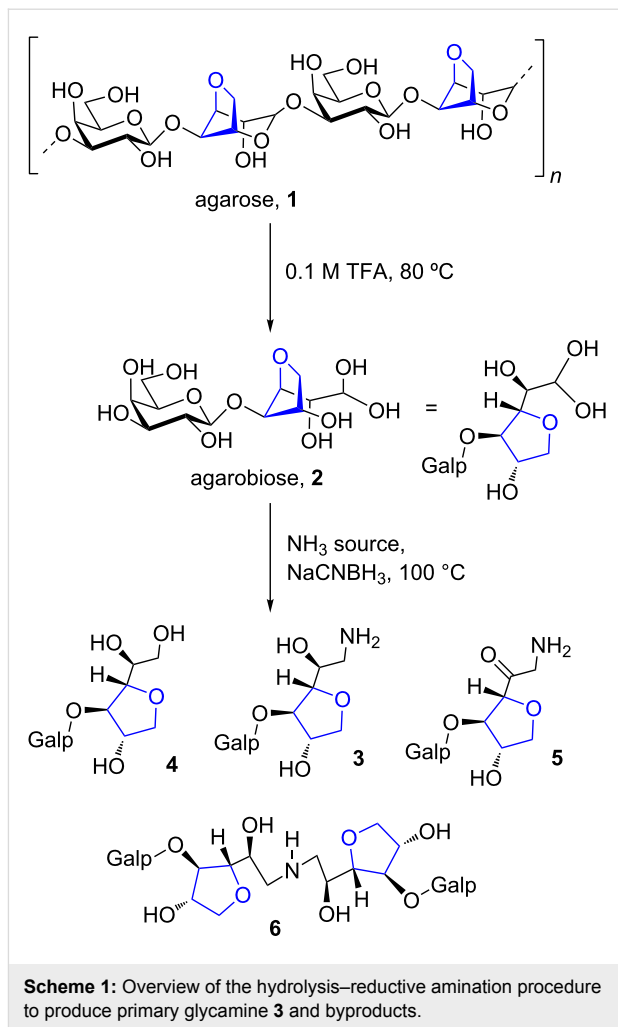
galactopyranose [1]. Both **1** and its less refined versions (agar or agar-agar) are well known due to their wide applications in food industry, microbiology and laboratorial sciences [2,3]. Even though agar and pure **1** are readily and commercially available, these polysaccharides are far little explored as sources

of chemical platforms for drug development. The rare monosaccharide 3,6-anhydro- α -L-galactopyranose (AnGal), naturally present in the agarose structure, is a valuable scaffold since it is a highly functionalized and a chiral-rich monomer. This moiety is indeed presumed to play an important role in the bioactivity of agar-oligosaccharides [4–6].

As AnGal appears polymerized within the agarose backbone, a conceivable way to obtain it as a free monosaccharide would involve the cleavage of the glycosidic linkages of the polysaccharide. The unpolymerized product shows AnGal as a *C*-threo-furanose motif [7] (see agarobiose, **2**, Scheme 1) and because *C*-glycosides are useful moieties for chemical synthesis and medicinal chemistry, agarose hydrolysis products can be considered interesting carbohydrate-based building blocks [8] to be employed in drug discovery. A part of our group has utilized this type of approach for the synthesis of dihydropyridine glycoconjugates [9] and antiviral sulfated alkylglycosides [10]. In an effort to amplify the utility of AnGal as a starting material for the synthesis of bioactive compounds, we have recently envisaged that its substituted *C*-threofuranose ring could serve as an excellent scaffold to build muscarine analogues [11]. Cholinergic agents targeting muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) have historically served for diverse applications in medicine [12,13] and recently regained interest because of their potential as drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease [14–17].

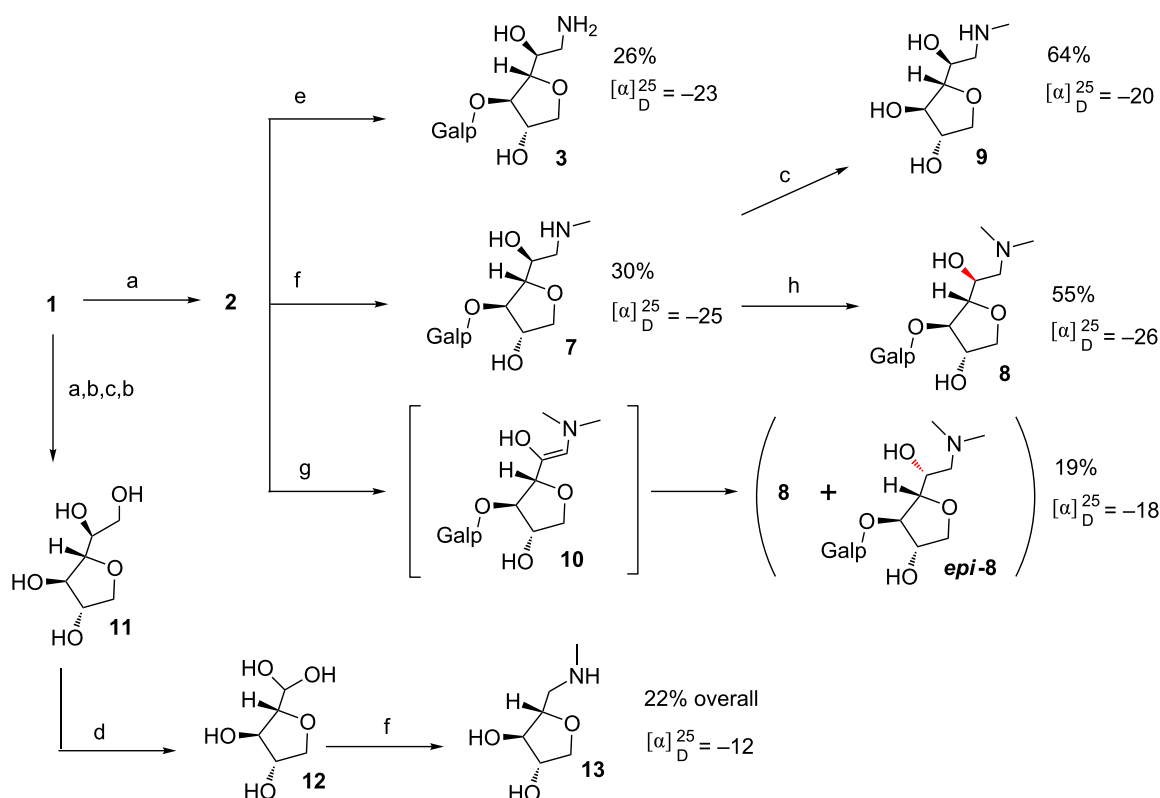
To effectively generate muscarine analogues from AnGal, an adequate strategy for the placement of an exocyclic amino group attached to the *C*-threofuranose ring is required. Because of the presence of an aldehyde hydrate moiety associated to free AnGal, such a strategy could be conducted through reductive amination reactions. Even though reductive amination has been widely used in organic synthesis, its applicability remains challenging when dealing with carbohydrates [18–20]. Rearrangements, enolization and dimerization are among the drawbacks that can be encountered during the transformation of mono- or oligosaccharides directly into glycamines. Considering (a) the potential of AnGal as starting material for the synthesis of glycamines structurally related to muscarine, (b) the suitability of reductive amination to accomplish such a synthesis through a short protecting-group-free route and (c) the compatibility of the starting material and all reaction conditions to the aqueous media, here we present the aqueous semisynthesis of mono- and disaccharide glycamines obtained by hydrolysis and reductive amination from commercially available agar.

Initially, in order to obtain the appropriate substrate for the synthesis of the *C*-glycoside glycamines **3**, **7** and **8** (Scheme 2), agarose (**1**) was submitted to partial hydrolysis to produce



Scheme 1: Overview of the hydrolysis–reductive amination procedure to produce primary glycamine **3** and byproducts.

disaccharide agarobiose (**2**, Scheme 1). For this purpose, we implemented a previously described hydrolysis process [8], which was conducted in aqueous TFA for 3 h at 80 °C to give a crude hydrolysate containing **2** as main constituent (for detailed procedures and NMR assignment see Supporting Information File 1). Considering the process of obtaining AnGal or AnGal-containing oligosaccharides from **1** by acid hydrolysis, it is important to notice that the 3,6-anhydrogalactosidic bonds are more acid labile than most of pyranoses. In this way, if AnGal is not produced as a free monosaccharide, it is found as the reducing terminal of the resulting oligosaccharides. Due to torsion angle restraints imposed by the preexisting 3,6-anhydro five-membered ring [21], free AnGal is also not able to recover its original pyranosidic form that is found within the polysaccharide structure. As a consequence, **2** presented a *C*-glycofuranose unit bearing a two-carbon appendix, which presents a hydroxy and an aldehyde hydrate group. Yet obtaining this type of product is not an easy task because of its acid liability. Hydrolysis conditions must be mild to avoid dehydration leading to hydroxymethyl furaldehyde byproduct [22].



Scheme 2: Overview of synthetic procedures, yields and specific rotation of glycamines **3**, **7**, **8**, *epi-8*, **9** and **13**. a) 0.1 M TFA, 80 °C; b) NaBH₄; c) 2.0 M TFA, 110 °C; d) NaIO₄; e) NH₄Ac, NaCNBH₃, pH 11, 100 °C; f) HCl·NH₂Me, NaCNBH₃, pH 11, 100 °C; g) HCl·NHMe₂, NaCNBH₃, pH 11, 100 °C; h) HCHO, NaCNBH₃, pH 11, 70 °C.

The crude agarose hydrolysate containing **2** was then directly employed for the synthesis of the primary glycamine **3** by means of reductive amination, which could be entirely conducted in aqueous media. Glycamines of monosaccharides have been extensively prepared via reductive amination; however, there are just few and laborious examples for the preparation of 1-deoxy-1-aminodisaccharides (those prepared from lactose, maltose and cellobiose) [23]. The primary stage of our optimization to obtain **3** consisted in evaluating the influence of different ammonium salts or ammonium hydroxide as nitrogen source to the reductive amination reactions (Table 1, entries 1–6). During this study we observed common byproducts related to the reductive amination of sugars [19] (Scheme 1). All the reaction conditions tested (Table 1) showed the presence of alditol **4** as a result of sodium cyanoborohydride lack of selectivity [20] to reduce imines in the presence of aldehydes. When using ammonium chloride and ammonium sulfate (Table 1, entries 5 and 6) a distinct product was detected in the reaction medium by mass spectroscopy (see Supporting Information File 1), which probably corresponded to a 1-amino-1-deoxyketose (compound **5**). This is known as an Amadori product [18] obtained from the characteristic rearrangement of the 1-deoxy-2-hydroxyimine

intermediate. Yet, the secondary amine *bis*-disaccharide **6** was frequently found as byproduct in the present work. It is a consequence of a sequential reductive amination of **3** with the remaining starting material **2**. Organic ammonium salts, acetate (Table 1, entry 3) and oxalate (Table 1, entry 4), provided superior yields compared with their inorganic counterpart, sulfate and chloride. The reductive amination reactions were herein conducted at pH 11. Although typical reductive aminations are conducted under acidic conditions, the use of basic settings has been advantageous to primary glycamines synthesis [19]. Under basic conditions increased amounts of free-base ammonia are created, thereby favoring the nucleophilic attack at the carbonyl group. Moreover, the base helps deprotonate the iminium ion intermediate pushing the reaction towards the imine product [20]. Attempts to conduct this reaction on acidic conditions failed as in other glycamines synthesis [19]. Experiment outlined in Table 1, entry 1, using ammonium hydroxide as ammonia source resulted in a complex mixture with no evidence of amine **3** formation. Reaction using ammonium carbonate (Table 1, entry 2) also ended up in a messy byproduct mixture and the poor isolated yield was also a consequence of the exhaustive chromatographic cleanup utilized. The most

Table 1: Synthesis optimization of glycamine **3**^a.

| Entry | NH ₃ source | NH ₃ (equiv) | Time (h) | [2] (mM) | 4 ^b | 5 ^b | 6 ^b | Yield 3 ^c (%) |
|----------------|---|-------------------------|----------|----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------------|
| 1 ^d | NH ₄ OH | 20 | 2 | 150 | + | – | – | 0 |
| 2 | (NH ₄) ₂ CO ₃ | 20 | 2 | 150 | + | – | + | 5 |
| 3 | NH ₄ Ac | 20 | 2 | 150 | + | – | + | 12 |
| 4 | (NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ | 20 | 2 | 150 | + | – | + | 10 |
| 5 | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 20 | 2 | 150 | + | + | + | 7 |
| 6 | NH ₄ Cl | 20 | 2 | 150 | + | + | + | 5 |
| 7 | NH ₄ Ac | 40 | 2 | 150 | + | – | + | 15 |
| 8 | NH ₄ Ac | 40 | 5 | 150 | + | – | + | 18 |
| 9 | NH ₄ Ac | 40 | 5 | 60 | + | – | – | 26 |

^aAll reactions conducted using aqueous media, 100 mg of **2**, sealed tube, 100 °C, 2.0 equiv NaCNBH₃ and pH 11 adjusted with triethylamine (TEA).

^bPresence (+) or absence (–) of byproduct **4**, **5** or **6**. Byproducts were detected in the reaction mixtures by TLC and characterized exclusively by low resolution mass spectrometry (LRMS, see Supporting Information File 1). Compound **4**: LRMS *m/z* calc. for [M + Na]⁺ C₁₂H₂₂NaO₁₀⁺: 349.1105; found: 349.10. Compound **5**: LRMS *m/z* calc. for [M + H]⁺ C₁₂H₂₂NO₉⁺: 324.1289; found: 324.19. Compound **6**: LRMS *m/z* calc. for [M + H]⁺ C₂₄H₄₄NO₁₈⁺: 634.2553; found: 634.27. ^cIsolated yields. ^dpH > 12.

problematic issue was to avoid byproduct **6**. Because of its similar adsorption characteristics to the desired amine **3**, it was difficult to chromatographically eliminate **6**. We could avoid **6** (and boost **3** yields significantly) by increasing the excess of ammonia (Table 1, entry 7) and by diluting the reaction media (Table 1, entry 9). These findings corroborate with the work of Dangerfield and co-workers [19]. Another pivotal aspect to achieve reasonable yields of **3** was the purification procedure. The huge excess of ammonium salts had a dreadful impact on workup since all cleanup steps were performed in aqueous media. The strategy employed to eliminate the salts was based on the use of a large amount of anionic exchange resin, which by eliminating acetate ions enabled the elimination of remaining ammonia by reduced pressure evaporation. The amino sugar rich fraction was then concentrated and chromatographed on silica gel using MeOH/2 M NH₄OH as mobile phase. An aqueous solution containing the isolated free-base glycamine was then carefully conducted to pH 4.0 with HCl to obtain the respective hydrochloride salt, which gave rise to a good quality NMR spectra.

We then applied the optimal conditions established for the synthesis of **3** (Table 1, entry 9) to obtain the secondary and tertiary glycamines **7** and **8** (Scheme 2). By performing the reductive amination between **2** and dimethylamine hydrochloride we obtained a mixture of epimers (**8** and *epi-8*) which differed on the stereochemistry of the C-2 of the 3,6-anhydro amino sugar moiety. This was related to the fact that during the course of the reductive amination, the intermediate to be reduced is enamine **10** (represented in Scheme 2). ¹H NMR of the mixture of **8** and *epi-8* indicated equal amounts for the two epimers, which gave two identical integration values for the distinctive *N*-methyl signals at 2.98 and 2.92 ppm, attributed to *epi-8* and **8**, respec-

tively (see Figure 1, spectrum in red). Aside from the *N*-methyl chemical shifts, NMR signals are otherwise indistinguishable for both epimers. This result indicated that even with prochiral C-2 of **10** being surrounded by a covalently linked chiral environment, no internal asymmetric induction took place during the reduction. The overall yields, which ranged between 19–30% for glycamine synthesis (Scheme 2), were considered satisfactory as they were calculated from crude agar starting material. Additionally, we highlight the 22% overall yield in the six-step synthesis of **13** as a good achievement. For detailed synthesis procedures see Supporting Information File 1.

We could access pure **8** by reacting **7** and formaldehyde under reductive conditions. The reaction product **8** kept the original configuration of its parenting analogue, amine **7**, because the reaction between such primary amine **7** and formaldehyde occurs via an imine intermediate (not shown), instead of with a prochiral enamine intermediate (such is the case of **10**). Specific rotation values ([α]_D) endorsed the above mentioned configuration aspects. Comparison of the ¹H NMR assignments shown by **3**, **7** and **8** indicated that the extra methyl appendices on amino group had impact on neighborhood chemical shifts (note H-1a, H-1b, H-2 and H-3, Figure 1). Even the coupling constant values (*J*) were slightly influenced (*J*_{H2-H3} = 3.6 Hz in **3** and **7**; *J*_{H2-H3} = 3.9 Hz in **8**, Table 2). The aforementioned might translate small conformational changes.

In order to extend our library, and to exercise starting material **1** versatility, we synthesized two other derivatives from AnGal, in this case lacking the galactopyranose unit (compounds **9** and **13**, Scheme 2). A handy approach would involve utilizing free AnGal, in its aldehyde form, as starting material; however, to the best of our knowledge, there is no available methodology to

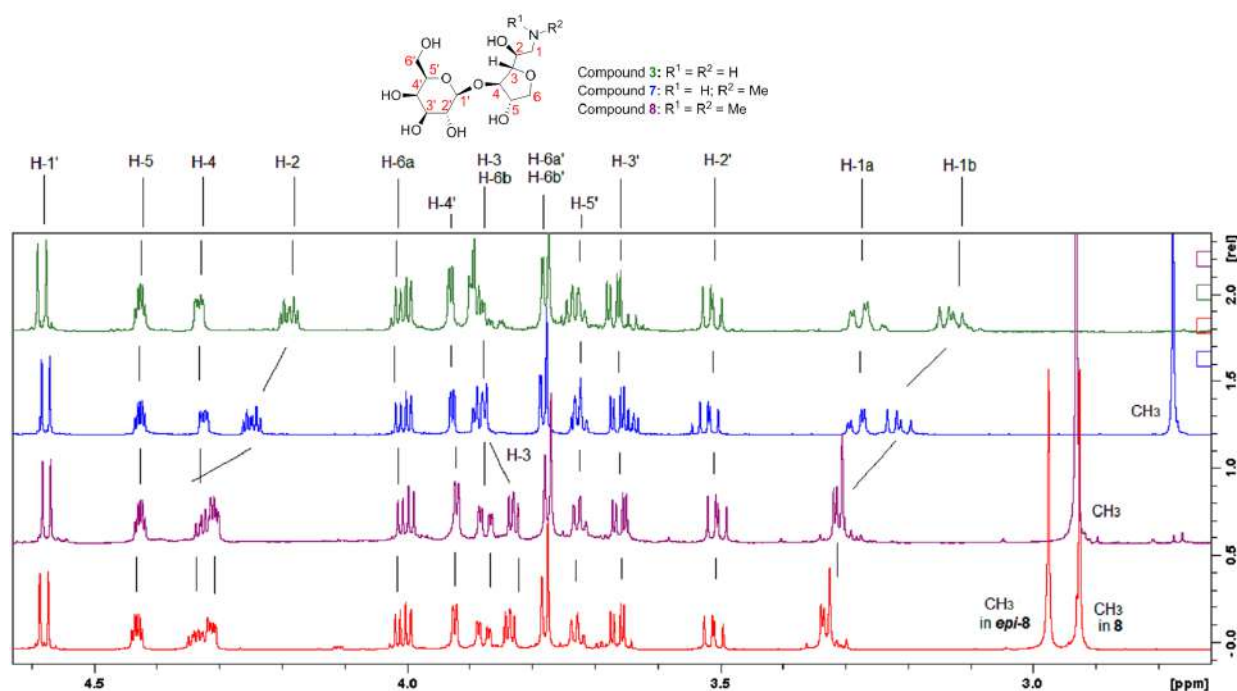


Figure 1: ^1H NMR spectrum comparison of glycamines at 600 MHz, D_2O , pH 4.0. Compound **3** in green, **7** in blue, **8** in purple and equimolar mixture **8+epi-8** in red.

Table 2: ^1H and ^{13}C NMR assignments of the AnGal unit of compounds **3**, **7** and **8**.

| Compound | 3 | | 7 | | 8 | |
|----------|-------------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|
| Position | $^1\text{H}^a$ | $^{13}\text{C}^b$ | $^1\text{H}^a$ | $^{13}\text{C}^b$ | $^1\text{H}^a$ | $^{13}\text{C}^b$ |
| 1a | 3.27 (dd, 3.6) | 42.9 | 3.28 (dd, 3.6) | 51.9 | 3.33 (m) nd | 59.7 |
| 1b | 3.12 (dd, 8.8) | 42.9 | 3.22 (dd, 9.0) | 51.9 | 3.33 (m) nd | 59.7 |
| 2 | 4.18 (dt, 3.6 /8.8) | 67.2 | 4.24 (dt, 3.6 /9.0) | 66.0 | 4.33 (dt, 3.9 /9.2) | 64.9 |
| 3 | 3.87 (m) nd | 85.0 | 3.87 (m) nd | 84.3 | 3.84 (dd, 3.9/4.9) | 84.1 |
| 4 | 4.32 (ddd, 0.5/2.5/4.9) | 85.9 | 4.32 (ddd, 0.5/2.5/4.9) | 85.9 | 4.31 (ddd, 0.5/2.5/4.9) | 85.9 |
| 5 | 4.42 (dt, 2.5/4.7) | 76.0 | 4.42 (dt, 2.5/4.7) | 76.0 | 4.42 (dt, 2.5/4.7) | 76.0 |
| 6a | 4.00 (dd, 4.7/10.2) | 73.8 | 4.00 (dd, 4.7/10.2) | 73.8 | 4.00 (dd, 4.7/10.2) | 73.8 |
| 6b | 3.88 (m) nd | 73.8 | 3.88 (m) nd | 73.8 | 3.88 (dd, 2.5/ 10.2) | 73.8 |
| N-Me | | | 2.77 (s) | 33.7 | 2.92 (s) | 42.0 |

^a ^1H NMR assignment at 600 MHz. Data acquired in D_2O at pH 4.0. Given values in δ ppm. Multiplicity and coupling constants (J) in Hz are given in brackets. ^b ^{13}C NMR chemical shifts determined by HSQC ^1H , ^{13}C correlation experiments. ndcoupling constant not determined due to signal overlapping.

obtain this building block using chemical hydrolysis. We produced compound **9** by hydrolysis of the previously synthesized glycamine **7**. In addition, we conducted a stepwise sequence of hydrolysis and reduction reactions, followed by periodate cleavage of the 1,2-vicinal diol of **11** to give **12**. From there, we obtained the corresponding methylamine derivative **13** by using the reductive amination conditions outlined herein. Compound **13** presents one less carbon between the five-membered ring and the amino group, in comparison to the other glycamines obtained. Both aminomonosaccharides **9** and **13** are interesting moieties, regarding their resemblance with the bioactive (+)-muscarine **14** (Figure 2). Indeed, ongoing docking and molecular dynamics experiments revealed the amino-AnGal moiety as a promising platform to launch the design of new mAChR modulators [11]. The differences in $J_{\text{Ha-Hb}}$ (Figure 2) observed between methylglycamines **7**, **9** and **13** evidenced a ring distortion. The influence of stereochemical features on the biological activity of those and other glycamines will be subject of future publications.

Conclusion

In sum we have explored agarose backbone and AnGal units to obtain C-glycofuranose-containing glycamines through a short, protecting-group-free and aqueous-based semisynthesis. Our present study also addressed the obstacles frequently faced in reductive amination of carbohydrates (such as byproduct accumulation and purification issues) and contributed to provide additional information to access a more efficient synthesis methodology. New amino-substituted C-threofuranosides, glycamines **3**, **7**, **8**, *epi*-**8**, **9** and **13**, were synthesized and characterized (see below general synthesis procedures and assignments). By adopting an alternative synthetic route, compound **8** could be obtained in the absence of its epimer, *epi*-**8**. Moreover, the chemical entities described herein offer opportunities for studies in glycobiology, biomedical chemistry and drug design. The use of these compounds as starting material to access new small ligands as GPCR modulators is ongoing in our laboratories and will be subject of a forthcoming publication.

Experimental

Reductive amination general procedure

Carbohydrate aldehyde hydrate (1.5 mmol) was dissolved in water (25 mL) then ammonium salts (40 equiv) or methylamine hydrochloride (30 equiv) or dimethylamine hydrochloride (8.5 equiv) were added and homogenized. pH 11 was adjusted with TEA and finally sodium cyanoborohydride (2 equiv) was added in a single portion. The flask was tightly closed immediately. This mixture was placed in a 100 °C glycerin bath and stirred for 5 hours. Hereafter the media was concentrated under reduced pressure, redissolved in water (100 mL) and stirred with strongly basic anion exchange resin (Amberlite IRA 410 – OH[−] form, 100 mL, 68 g) for 1 hour. The resin was filtered and washed with water (2 × 100 mL). The filtrate was dried under reduced pressure using co-evaporation with EtOH. This crude material was dissolved in warm MeOH (50 mL), filtered through a borosilicate sintered funnel and dried under reduced pressure. Finally the crude was submitted to flash chromatography (Silica Gel 60, Eluent: MeOH/2 M NH₄OH 6:1) to give the pure glycamine.

Physical data and spectral assignments

Compound 3: [α]_D: −23.0 (*c* 1.0, H₂O); ¹H NMR (600 MHz, D₂O, pH 4.0, ppm) δ 4.57 (d, $J_{\text{H1'-H2'}}$ = 7.8 Hz, 1H, H1'), 4.42 (dt, $J_{\text{H5-H4}}$ = 2.5 Hz, $J_{\text{H5-H6a}}$ = 4.7 Hz, 1H, H5), 4.32 (ddd, J = 0.5 Hz, $J_{\text{H4-H5}}$ = 2.5 Hz, $J_{\text{H4-H3}}$ = 4.9 Hz, 1H, H4), 4.18 (dt, $J_{\text{H2-H3}}$ = 3.6 Hz, $J_{\text{H2-H1a}}$ = 8.8 Hz, 1H, H2), 4.00 (dd, $J_{\text{H6a-H5}}$ = 4.7 Hz, $J_{\text{H6a-H6b}}$ = 10.2 Hz, 1H, H6a), 3.92 (dd, $J_{\text{H4'-H5'}}$ = 0.7 Hz, $J_{\text{H4'-H3'}}$ = 3.4 Hz, 1H, H4'), 3.88 (m, 1H, H6b), 3.87 (m, 1H, H3), 3.78 (dd, $J_{\text{H6'-H5'}}$ = 5.9 Hz, 2H, H6a' and H6b'), 3.71 (m, 1H, H5'), 3.66 (dd, $J_{\text{H3'-H4'}}$ = 3.4 Hz, $J_{\text{H3'-H2'}}$ = 9.9 Hz, 1H, H3'), 3.51 (dd, $J_{\text{H2'-H1'}}$ = 7.8 Hz, $J_{\text{H2'-H3'}}$ = 9.9 Hz, 1H, H2'), 3.27 (dd, $J_{\text{H1a-H2}}$ = 3.6 Hz, 1H, H1a), 3.12 (dd, $J_{\text{H1b-H2}}$ = 8.8 Hz, 1H, H1b); ¹³C NMR (600 MHz, D₂O, pH 4.0, ppm) δ 103.0 (C1'), 85.9 (C4), 85.0 (C3), 76.2 (C5'), 76.0 (C5), 73.8 (C6), 73.3 (C3'), 71.4 (C2'), 69.4 (C4'), 67.2 (C2), 62.0 (C6'), 42.9 (C1); HRMS: m/z [M + H]⁺ calcd for C₁₂H₂₄NO₉⁺: 326.1451, found: 326.1469.

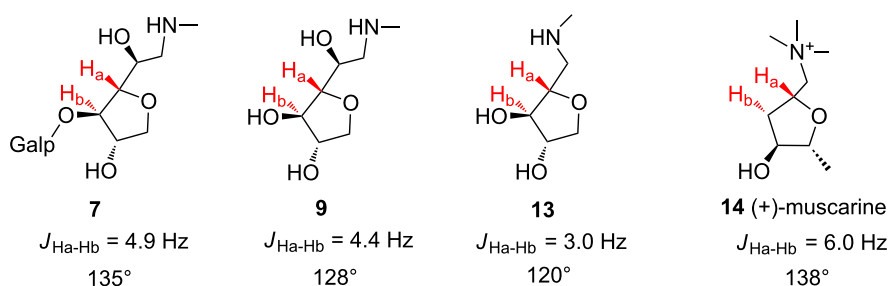


Figure 2: Comparison of the ring distortion among glycamines **7**, **9** and **13**, and (+)-muscarine **14**. Torsion angles calculated with DAD equation [24]. Experimental coupling data from ¹H NMR at 600 MHz, D₂O, pH 4.0. Compound **14** NMR coupling data retrieved from literature [25].

Compound 7: [α]_D: −25.0 (*c* 1.0, H₂O); ¹H NMR (600 MHz, D₂O, pH 4.0, ppm) δ 4.57 (d, $J_{H1'-H2'} = 7.8$ Hz, 1H, H1'), 4.42 (dt, $J_{H5-H4} = 2.5$ Hz, $J_{H5-H6a} = 4.7$ Hz, 1H, H5), 4.32 (ddd, $J = 0.5$ Hz, $J_{H4-H5} = 2.5$ Hz, $J_{H4-H3} = 4.9$ Hz, 1H, H4), 4.24 (dt, $J_{H2-H3} = 3.6$ Hz, $J_{H2-H1a} = 9.0$ Hz, 1H, H2), 4.00 (dd, $J_{H6a-H5} = 4.7$ Hz, $J_{H6a-H6b} = 10.2$ Hz, 1H, H6a), 3.92 (dd, $J_{H4'-H5'} = 0.7$ Hz, $J_{H4'-H3'} = 3.4$ Hz, 1H, H4'), 3.88 (m, 1H, H6b), 3.87 (m, 1H, H3), 3.78 (dd, $J_{H6'-H5'} = 5.9$ Hz, 2H, H6a-b'), 3.71 (m, 1H, H5'), 3.66 (dd, $J_{H3'-H4'} = 3.4$ Hz, $J_{H3'-H2'} = 9.9$ Hz, 1H, H3'), 3.51 (dd, $J_{H2'-H1'} = 7.8$ Hz, $J_{H2'-H3'} = 9.9$ Hz, 1H, H2'), 3.28 (dd, $J_{H1a-H2} = 3.6$ Hz, 1H, H1a), 3.22 (dd, $J_{H1b-H2} = 9.0$ Hz, 1H, H1b), 2.77 (s, 1H, CH₃); ¹³C NMR (600 MHz, D₂O, pH 4.0, ppm) δ 103.0 (C1'), 85.9 (C4), 84.3 (C3), 76.2 (C5'), 76.0 (C5), 73.8 (C6), 73.3 (C3'), 71.4 (C2'), 69.4 (C4'), 66.0 (C2), 62.0 (C6'), 51.9 (C1), 33.7 (CH₃); HRMS: *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₁₃H₂₆NO₉⁺: 340.1608, found: 340.1631.

Compound 8 + epi-8: [α]_D: −26.0 (*c* 1.0, H₂O) for pure compound **8**; [α]_D: −18.0 (*c* 1.0, H₂O) for equimolar mixture (**8** + *epi-8*); ¹H NMR (600 MHz, D₂O, pH 4.0, ppm) δ 4.57 (d, $J_{H1'-H2'} = 7.8$ Hz, 1H, H1'), 4.42 (dt, $J_{H5-H4} = 2.5$ Hz, $J_{H5-H6a} = 4.7$ Hz, 1H, H5), 4.33 (dt, $J_{H2-H3} = 3.9$ Hz, $J_{H2-H1a} = 9.2$ Hz, 1H, H2), 4.31 (ddd, $J = 0.5$ Hz, $J_{H4-H5} = 2.5$ Hz, $J_{H4-H3} = 4.9$ Hz, 1H, H4), 4.00 (dd, $J_{H6a-H5} = 4.7$ Hz, $J_{H6a-H6b} = 10.2$ Hz, 1H, H6a), 3.92 (dd, $J_{H4'-H5'} = 0.7$ Hz, $J_{H4'-H3'} = 3.4$ Hz, 1H, H4'), 3.88 (dd, $J_{H6b-H5} = 2.5$, $J_{H6b-H6a} = 10.2$, 1H, H6b), 3.84 (dd, $J_{H3-H4} = 4.9$ Hz, 1H, H3), 3.78 (dd, $J_{H6'-H5'} = 5.9$ Hz, 2H, H6a'/6b'), 3.71 (m, 1H, H5'), 3.66 (dd, $J_{H3'-H4'} = 3.4$ Hz, $J_{H3'-H2'} = 9.9$ Hz, 1H, H3'), 3.51 (dd, $J_{H2'-H1'} = 7.8$ Hz, $J_{H2'-H3'} = 9.9$ Hz, 1H, H2'), 3.33 (m, 2H, H1a and H1b), 2.98 (s, *epi-8* CH₃), 2.92 (s, compound **8** CH₃); ¹³C NMR (600 MHz, D₂O, pH 4.0, ppm) δ 103.0 (C1'), 85.9 (C4), 84.1 (C3), 76.2 (C5'), 76.0 (C5), 73.8 (C6), 73.3 (C3'), 71.4 (C2'), 69.4 (C4'), 64.9 (C2), 62.0 (C6'), 59.7 (C1), 45.0 (*epi-8* CH₃), 42.0 (compound **8** CH₃); HRMS: *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₁₄H₂₈NO₉⁺: 354.1764, found: 354.1764.

Compound 9: [α]_D: −20.0 (*c* 1.0, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 4.25 (m, $J = 2.6$ Hz, 1H, H5), 4.13 (m, 2H, H2, H4), 4.01 (dd, $J = 2.6/9.9$, 1H, H6a), 3.85 (dd, $J = 9.9$, 1H, H6b), 3.73 (m, $J_{H3-H4} = 4.4$ Hz, 1H, H3), 3.27 (dd, $J = 12.9$ Hz, 1H, H1a), 3.15 (m, 1H, H1b), 2.77 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 86.0 (C3), 78.7 (C4), 77.5 (C5), 73.5 (C6), 66.7 (C2), 52.1 (C1), 33.5 (CH₃); HRMS: *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₇H₁₆NO₄⁺: 178.1079, found: 178.1072.

Compound 13: [α]_D: −12.0 (*c* 1.0, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O, ppm) δ 4.18 (dd, $J = 1.6/3.6$ Hz, 1H, H4), 3.97 (m, 2H, H5a and H3), 3.95 (m, $J_{H2-H3} = 3.0$ Hz, 1H, H2), 3.84 (dd, $J = 1.6/10.1$ Hz, H5b), 3.08 (m, 2H, H1a and H1b), 2.57 (CH₃); ¹³C NMR (400 MHz, D₂O, ppm) δ 81.7 (C-2), 79.1 (C-3), 76.5

(C-4), 73.2 (C-5), 50.9 (C-1), 33.5 (CH₃); HRMS: *m/z* [M + H]⁺ calcd for C₆H₁₄NO₃⁺: 148.0974, found: 148.0920.

Supporting Information

Supporting Information File 1

General methods; LRMS of a reductive amination reaction mixture using NH₄Cl as NH₃ source; detailed synthesis procedures; complete assignments and NMR data (¹H NMR, ¹³C NMR and HSQC spectrum copies).
[<http://www.beilstein-journals.org/bjoc/content/supplementary/1860-5397-13-121-S1.pdf>]

Acknowledgements

This work was supported by grants from Fundação Araucária (15152), CAPES and PRONEX-Carboidratos (14669). J. C. C. D. thanks the scholarship from CAPES. M. E. D and M. D. N are research members of CNPq (National Research Council of Brazil). The authors are thankful to Professor Guilherme Sasaki and Professor Anderson Barison from UFPR NMR Center for NMR experiments and to Professor Marcelo Müller dos Santos for HRMS experiments.

References

- Craigie, J. S. Cell walls. In *Biology of the red algae*; Cole, K.; Sheath, R., Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1990; pp 221–257.
- Delattre, C.; Fenoradosoa, T. A.; Michaud, P. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2011**, *54*, 1075–1092. doi:10.1590/S1516-89132011000600002
- Lahaye, M. J. *Appl. Phycol.* **2001**, *13*, 173–184. doi:10.1023/A:1011142124213
- Yun, E. J.; Lee, S.; Kim, J. H.; Kim, B. B.; Kim, H. T.; Lee, S. H.; Pelton, J. G.; Kang, N. J.; Choi, I.-G.; Kim, K. H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 2961–2970. doi:10.1007/s00253-012-4184-z
- Gruner, S. A. W.; Locardi, E.; Lohof, E.; Kessler, H. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 491–514. doi:10.1021/cr0004409
- Chen, H.-M.; Zheng, L.; Yan, X.-J. *Food Technol. Biotechnol.* **2005**, *43*, 29–36.
- Ducatti, D. R. B.; Colodi, F. G.; Gonçalves, A. G.; Duarte, M. E. R.; Nosedá, M. D. *Braz. J. Pharmacogn.* **2011**, *21*, 296–304. doi:10.1590/S0102-695X2011005000080
- Ducatti, D. R. B.; Massi, A.; Nosedá, M. D.; Duarte, M. E. R.; Dondoni, A. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 576–588. doi:10.1039/B816606D
- Ducatti, D. R. B.; Massi, A.; Nosedá, M. D.; Duarte, M. E. R.; Dondoni, A. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1980–1986. doi:10.1039/b900422j
- Gonçalves, A. G.; Nosedá, M. D.; Duarte, M. E. R.; Grindley, T. B. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9896–9904. doi:10.1021/jo701413y

11. Dallagnol, J. C. C.; Arantes, P. R.; Pedebos, C.; Braun, R. L.; Duarte, M. E. R.; Nosedá, M. D.; Ducatti, D. R. B.; Verli, H.; Gonçalves, A. G. Influence of ring conformation on interactions of a carbohydrate based compound in a M1 muscarinic acetylcholine receptor model. 7th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, Campos do Jordão; 2014; DDD–044.
12. Caulfield, M. P.; Birdsall, N. J. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 279–290.
13. Eglen, R. M. *Auton. Autacoid Pharmacol.* **2006**, *26*, 219–233. doi:10.1111/j.1474-8673.2006.00368.x
14. Clader, J. W.; Wang, Y. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 3353–3361. doi:10.2174/138161205774370762
15. Fisher, A. A. *Neurotherapeutics* **2008**, *5*, 433–442. doi:10.1016/j.nurt.2008.05.002
16. Decker, M.; Holzgrabe, U. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 752–762. doi:10.1039/c2md20025b
17. Davie, B. J.; Christopoulos, A.; Scammells, P. J. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4*, 1026–1048. doi:10.1021/cn400086m
18. Cosenza, V. A.; Navarro, D. A.; Stortz, C. A. *ARKIVOC* **2011**, No. vii, 182–194.
19. Dangerfield, E. M.; Plunkett, C. H.; Win-Mason, A. L.; Stocker, B. L.; Timmer, M. S. M. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 5470–5477. doi:10.1021/jo100004c
20. Baxter, E. W.; Reitz, A. B., Eds. *Reductive Aminations of Carbonyl Compounds with Borohydride and Borane Reducing Agents; Organic Reactions*; Wiley: 2004. doi:10.1002/0471264180.or059.01
21. Rochas, C.; Potin, P.; Kloareg, B. *Carbohydr. Res.* **1994**, *253*, 69–77. doi:10.1016/0008-6215(94)80056-1
22. Kim, C.; Ryu, H.-J.; Kim, S.-H.; Yoon, J.-J.; Kim, H.-S.; Kim, Y.-J. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2010**, *31*, 511–514. doi:10.5012/bkcs.2010.31.02.511
23. Christiansen-Brams, I.; Meldal, M.; Bock, K. J. *Carbohydr. Chem.* **1992**, *11*, 813–835. doi:10.1080/07328309208018272
24. Donders, L. A.; De Leeuw, F. A. A. M.; Altona, C. *Magn. Reson. Chem.* **1989**, *27*, 556–563. doi:10.1002/mrc.1260270608
25. Adams, J.; Poupart, M.-A.; Grenier, L. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1753–1756. doi:10.1016/S0040-4039(00)99571-6

License and Terms

This is an Open Access article under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The license is subject to the *Beilstein Journal of Organic Chemistry* terms and conditions: (<http://www.beilstein-journals.org/bjoc>)

The definitive version of this article is the electronic one which can be found at:
doi:10.3762/bjoc.13.121